Akkumulation von Benzo(a)pyren in Zellen in Abhängigkeit von Umgebungsparametern

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
angenommene Dissertation

Herbert Kowitz
geb. am 13. August 1949 in Weinheim

1986

Akkumulation von Benzo(a)pyren in Zellen in Abhängigkeit von Umgebungsparametern

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
angenommene Dissertation

Herbert Kowitz
geb. am 13. August 1949 in Weinheim

Referent: Prof. Dr. Erich Zeeck
Korreferent: Prof. Dr. Dieter Schuller
Tag der Disputation: 20. Juni 1986

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Anwendung geeigneter Zellkulturtechniken wird mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gezeigt, daß 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-azetat (TPA) die Aufnahme von 3,4-Benzpyren (BP) in Säugerzellen beschleunigt, wenn das Medium serumfrei ist. Verglichen mit serumhaltigem Medium wird BP in serumfreiem Medium stärker akkumuliert. TPA verstärkt diesen Effekt. In Gegenwart von Serum verstärkt TPA die BP-Aufnahme nicht.

Mit den gleichen Methoden wurden die Einflüsse untersucht, welche die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin auf die Akkumulation von BP in Säugerzellen ausüben.

Diese Amine kommen ubiquitär in den Geweben lebender Organismen vor und haben wichtige Funktionen bei der Steuerung der Zellteilung.

In serumfreiem Medium ist die BP-Akkumulation bei Gegenwart dieser Amine wesentlich verringert.

Putrescin zeigt gelegentlich einen geringeren Effekt als die anderen Amine. Ursache hierfür kann die geringe Menge Putrescin sein, die auch in serumfreiem Medium vorhanden ist.

Lipophile Proteine im Serum beeinflussen die Verteilung einer lipophilen Substanz wie BP zwischen Zelle und serumhaltigem Medium in dem Sinne, daß mehr BP im Medium verbleibt und weniger in die Zellen eindringt, als es in serumfreiem Medium der Fall wäre.

Die Ergebnisse der Messungen geben einen Hinweis darauf, daß die BP-Akkumulation in Säugerzellen nicht ausschließlich auf dieser Einstellung eines Verteilungsgleichgewichtes zwischen Zelle und Medium beruht.

Die hier untersuchten Amine liegen bei einem physiologischen pH-Wert nahezu vollständig als Ionen vor. Dennoch behindern sie als hydrophile Substanzen im Medium die Akkumulation des lipophilen BP durch die Zellen ganz wesentlich.

Abstract

By applying suitable cell-culture techniques with the aid of fluorescence microscopy it is demonstrated, that 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate increases the uptake of benzo(a)pyrene (BP) in mammalian cells, if the medium is free from serum. In comparison with serum containing medium the BP-uptake is augmented in medium that is free from serum. TPA intensifies this effect. In presence of serum TPA does not intensify the BP-uptake.

The influence of the polyamines putrescine, spermidine and spermine on the accumulation of BP in mammalian cells was investigated by the same methods.

These amines occur ubiquitously in the tissues of living organisms and play an important role in controlling the cell-division.

The accumulation of BP in medium free from serum is reasonable reduced if these amines are present.

In some cases the influence of putrescine is not of the same intensity as that of the other amines. The cause could be the small amount of putrescine that is found even in medium that is free from serum.

The lipophilic proteins in the serum influence the distribution of a lipophilic substance, such as BP, between cell and medium containing serum, in that way, that more BP remains in the medium and less BP invases into the cells, than it would be the case in medium free from serum.

The results of the measurements give a hint, that the accumulation of BP in mammalian cells is not only ruled by the adjustment of the distribution equlibrium between cell and medium.

The amines regarded here are approximately completely present in their ionic form at a physiological pH. Nevertheless they influence in this hydrophilic form the accumulation of the lipophilic BP in an essential way.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einleitung	1
2	Problemstellung	4
2.1	Struktur und kanzerogene Aktivität	4
2.2	Reaktionswege einer Fremdsubstanz in Zelle	8
2.2.1	Der "Ames Test"	15
2.3	Carcinogenese als Mehrstufenprozess	17
2.4	Möglichkeiten der fluorimetrischen Messungen	20
3	Materialien und Methoden	21
3.1	Die Zellkultur	21
3.1.1	Begriffe und Definitionen	21
3.1.2	Die Zelle	24
3.1.3	Die Zellteilung	26
3.1.4	Zellkultur-Techniken	28
3.1.4.1	Die Passage	37
3.1.4.2	Die Züchtung und Handhabung von Zellkulturen	39
3.1.4.3	Der Aufbau der Zellkultur	40

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546313_0031

3.2	Grundlagen der Lumineszenz	54
3.2.1	Licht und seine Wechselwirkung mit Materie	54
3.2.2	Strahlungslose Vernichtung der Anregungsenergie	59
3.2.3	Desaktivierung elektronisch angeregter Moleküle durch Lichtemission	63
3.2.3.1	Fluoreszenz	63
3.2.3.1.1	Einflüsse auf die Lage der Fluoreszenzbande	66
3.2.3.1.2	Parameter zur Beschreibung der Fluoreszenz	68
3.2.3.1.3	Quantitative Grundlagen	70
3.2.3.1.4	Meßbedingungen für die quantitative Fluoreszenzanalytik	72
3.2.3.2	Phosphoreszenz	73
3.2.3.3	Verzögerte Fluoreszenz	75
3.2.4	Lumineszenzlöschung	76
3.2.4.1	Häufig störende Quencher	79
3.2.4.1.1	Sauerstoff	79
3.2.4.1.2	Quenching durch Metallionen	80

3.2.4.1.3	Konzentrationseffekte	81
3.2.5	Effekte mit polarisiertem Licht	86
3.3	Aufbau und Durchführung der Messungen	91
3.3.1	Aufbau des Mikroskop-Photometers	91
3.3.2	Vorbereitung der Proben	94
3.3.3	Durchführung der Messungen	95
3.3.4	Nachteile der Meßanordnung	96
4	Ergebnisse	99
4.1	Gegensätzliche Einflüsse von TPA und Serum auf die Akkumulation von 3,4-Benzpyren in Säugerzellen	99
4.1.1	Versuchsbedingungen	99
4.1.2	Ergebnisse und Diskussion	102
4.2	Hinderung der Aufnahme von 3,4-Benzpyren in Zellen durch Polyamine	107
4.2.1	Versuchsbedingungen	107
4.2.2	Ergebnisse und Diskussion	109
5	Zusammenfassung	113
6	Literaturverzeichnis	115

1 EINLEITUNG

Das Thema, mit dem sich die vorliegende Arbeit befaßt, läßt sich einreihen in den großen Themenbereich "Krebsforschung". Die heutige Krebsforschung aber ist nun nahezu ein Paradebeispiel für eine sogenannte Verbundwissenschaft. Chemiker, Biochemiker, Naturstoffchemiker, Physiker, Pathologen, Virologen und Toxikologen bemühen sich herauszufinden, was eine Tumorzelle eigentlich ist.

Bis heute läßt sich nicht genau angeben, welche molekularbiologischen Fakten die Krebszelle von einer Normalzelle unterscheiden.

Normales Leben möchte wachsen und sich vermehren, aber wenn sich Zellen zu einem Organismus zusammentun, muß ihr Wachstum im Interesse des Ganzen reguliert werden. Ein höherer Organismus ist nur mit einer streng repressiven Wachstumspolitik möglich. Diese Regeln müssen rigoros eingehalten werden. Jede Abweichung aus dem normalen Programm ist für den Gesamtorganismus tödlich.

Liegt eine Störung in diesem Mechanismus für Zellteilung und Differenzierung vor, die weitervererbt wird, spricht man von Krebs.

Alle Zellen in einem Organismus stammen von einer einzigen, dem befruchteten Ei, ab. Nach kurzer Entwicklungszeit lassen sich 3 verschiedene "Keimblätter", das Ektoderm ,das Mesoderm und das Endoderm,voneinander unterscheiden.

Aus dem Ektoderm entstehen alle Epithelzellen ,die die äußere Oberfläche des Körpers bedecken und sich bis in Mund- und Nasenbereich ausdehnen. Auch das Nervensystem ist ektodermalen Ursprungs.

Aus dem Mesoderm entwickeln sich die Körpermuskeln, das Urogenitalsystem, alles Bindegewebe, das Blut und die endothelialen Oberflächen der Körperhöhlen.

Aus dem Endoderm entstehen alle Epithelien, die den Verdauungstrakt auskleiden, die Atmungswege und die unteren Teile der Genital- und Harnwege. Auch die epithelialen Zellen der Leber und des Pankreas entstehen aus dem Endoderm.

Der größere Teil (70-80%) des Gewebes entwickelt sich aus dem Mesoderm. Bösartige Wachstumsformen mesodermalen Ursprungs nennt

man Sarkome. Bösartige Wachstumsformen aus Gewebe ektodermalen oder endodermalen Ursprungs werden Karzinome genannt.
Ausnahmen von dieser Regelung sind lediglich bösartige Wachstumsformen der Nervenzellen und des Blut- und Lymphgewebes.
Bösartiges Wachstum bei Nervenzellen bezeichnet man als Gliome, das bei Blut- und Lymphgewebe als Leukämieen, selten auch als Sarkom.

Heute ist bekannt, daß man diese Wachstumsirritationen künstlich hervorrufen kann.
Die Art der Anregungen läßt sich einteilen in physikalische, biologische und chemische Einwirkungen.
Physikalische Anregung etwa wäre: Tumorbildung durch Strahlung, oder auch die Reizung durch künstliche Implantate,
biologische Anregung durch Viren
und schließlich chemische Anregung durch Chemikalien. Auch Kombinationen dieser Methoden sind möglich.
Die hier vorliegende Arbeit befaßt sich mit einem Teilaspekt der chemischen Initiierung.
Schon im Jahre 1775 entdeckte der englische Arzt Percival Pott (1), daß Schornsteinfeger besonders häufig unter Hodenkrebs litten.
Diese Schornsteinfeger hatten als Kinder in den Schornsteinen herumklettern müssen, um dort den Ruß von den Mauern zu klopfen.

Erst 1915 aber gelang es den Japanern Yamagiwa und Ichikawa (2), mit Teerbepinselungen Tumore auf Kaninchenohren zu erzeugen.
Dies war wohl der erste gelungene Versuch zur chemischen Karzinogenese.
Man lernte bald, daß auch bei Mäusen mit Teerbepinselungen auf die Rückenhaut Geschwulste erzeugt werden konnten.Dies war ein großer Fortschritt, da diese Tiere leicht zugänglich und in großer Zahl vorhanden waren. Die Versuche konnten nun wesentlich ausgeweitet werden.
Kennaway und seinem Assistenten Goulden gelang es, Teere aus verschiedenen Materialien wie Hefe, Menschenhaar, Isopren und Haut herzstellen, die aktiv waren, wenn man sie auf Mäusehaut aufpinselte (3).
Die logische Aufgabe war es nun, herauszubekommen, welche der

vielen Substanzen, die in Teer enthalten sind, für die Kanzerogenität verantwortlich ist. Dies bei der Vielzahl der Substanzen herauszufinden und jede der gefundenen Substanzen einem biologischen Test zu unterwerfen erschien unmöglich.
Einzige Spur war das Fluoreszenzspektrum des schon bekannten 1,2-Benzanthracens, das dem Fluoreszenzspektrum der kanzerogenen Teere sehr ähnlich war. Man vermutete, daß das Kanzerogen den Benzanthracenkern mit irgendwelchen Substituenden enthielt. Cook, Hewett und Hieger extrahierten schließlich 2 Tonnen Pech mit Methanol, reinigten und kristallisierten um und erhielten schließlich wenige Gramm einer gelben kristallinen Substanz (4). Diese Substanz war stark kanzerogen. Durch Vergleiche mit inzwischen synthetisch hergestelltem 3,4-Benzpyren stellte man fest, daß diese Substanzen identisch waren.

Heute nun ist es so, daß in unserer Umwelt wohl kaum noch eine Nische existiert, die frei sein könnte von 3,4-Benzpyren. Benzpyren befindet sich in Abgasen von Zweitakt- und Dieselmotoren (5), in der Unterwäsche von Kokereiarbeitern (6), in Formsandmischungen (Glasindudtrie) und in Gießereistaub (7). Luftstäube und Aerosole enthalten 3,4-Benzpyren (8).Rheinwasser soll 1980 einen Gehalt von 0,033µg 3,4-Benzpyren pro Liter Wasser gehabt haben (9). In Zigarettenrauch, geräucherten Lebensmitteln und Trinkwasser kann 3,4-Benzpyren nachgewiesen werden. In der Bundesrepublik Deutschland gibt es Vorschriften über den Gehalt von Benzpyren in Lebensmitteln bzw. in Wasser (10,11, 12,13,14)
Überall auf der Welt werden in vivo und in vitro Versuche unternommen, um das Geheimnis der Karzinogenese durch 3,4-Benzpyren weiter zu lüften.
Einer der vielen Wege, auf denen versucht wird, dieses Ziel zu erreichen, ist die Durchführung von Versuchen an lebenden Zellen menschlichen oder tierischen Ursprungs.

2 Problemstellung

2.1 Struktur und kanzerogene Aktivität

Nachdem es gelungen war, das 3,4-Benzpyren rein darzustellen, wurde eine große Anzahl weiterer polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe synthetisiert. Auch unter der Vielzahl dieser nunmehr bekannten Substanzen behielt das 3,4-Benzpyren seine Rolle als äußerst potentes Kanzerogen bei.
Da 3,4-Benzpyren auf gesunde Zellen eine so starke Wirkung ausübt, schloß K. H. Bauer 1937 (15), daß es auch auf Krebszellen, analog der Röntgenstrahlung, eine starke Wirkung ausüben müsse.

Bauer behandelte nach Vorversuchen mit Mäusen 22 Krebskranke mit einer Lösung von 0,5% 3,4-Benzpyren in Ether. Sieben Patienten wurden geheilt(16).

Viele Versuche wurden unternommen, um die chemische Struktur der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe mit der biologischen Aktivität zu verknüpfen.

Die meisten kanzerogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe enthalten als Untereinheit die drei gewinkelten Ringe des Phenanthrens.

Pullman (17) sprach der 4-5-Bindung des Phenanthrens einen höheren Doppelbindungscharakter zu und nannte sie "K-Region". Die K-Region sollte ausschlaggebend sein für die kanzerogene Potenz der jeweiligen Substanz.

Zunächst schien die Pullman'sche Theorie mit der Praxis übereinzustimmen. Mit der Zeit zeigte sich jedoch, daß eine aktive K-Region alleine die Kanzerogenität eines polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs nicht begründen konnte.

Eine inaktive "L-Region" (Kohlenstoffe 5 und 10 beim Anthracen) in Verbindung mit einer aktiven K-Region sollten die kanzerogene Aktivität begründen (18).

Viele Substanzen, für die nach dieser Theorie eine hohe kanzerogene Aktivität vorausgesagt wurde, erwiesen sich dann im Test allerdings als unwirksam. Die Theorie wurde unhaltbar.

Bis etwa 1968 hielt sich die Theorie, daß die Karzinogenese durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe auf der physikalischeen Interkalation der Aromate in die DNS beruhe (19,20).

1969 vermuteten J. A. Miller und E. C. Miller, daß chemische Karzinogene entweder elektrophile Agentien per se seien, oder aber zu elektrophilen Agentien metabolisiert würden (21,22). Diese elektrophilen Agentien gehen kovalente Bindungen mit Makromolekülen der Zelle ein. Solche kovalenten Wechselwirkungen müssen zu biologischen Auswirkungen führen.

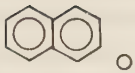
Bei Versuchen, verschiedene mögliche Metabolite des 3,4-Benzpyrens in Gegenwart von mikrosomalen Hamsterleberfraktionen an DNS zu binden, zeigte sich, daß das trans-BP-7,8-Dihydrodiol in wesentlich stärkerem Umfang an die DNS gebunden wurde, als Benzpyren selbst (23). Dies war ein eindeutiger Hinweis dafür, daß diese Substanz eine Zwischenstufe sein mußte bei der Metabolisierung des 3,4-Benzpyrens.

Tatsächlich erwies sich das trans-7,8-Dihydrodiol des 3,4-Benzpyrens als "proximates" Karzinogen. Durch Vergleiche mit der DNS, die aus Zellen gewonnen wurde, die mit 3,4-Benzpyren behandelt waren, ergab sich das 7,8-Diol-9,10- Epoxid des 3,4-Benzpyrens als "ultimates" Karzinogen (24).

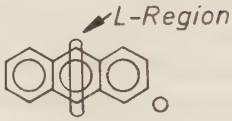
Dieses "bay-region"-Diol-Epoxid besitzt größere Aktivität als andere Diol-Epoxide (25).
Allgemein scheinen "bay-region"-Diol-Epoxide eine große Rolle bei der metabolischen Aktivierung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe zu spielen. Auch quantenmechanische Berechnungen unterstützen die sog. "Bay-Region-Theorie", die für bay-region-Diol-Epoxide eine höhere Aktivität voraussagen als für Moleküle ohne "bay-region" (26,27,28,29,30,31).
Abbildung 1 zeigt die Strukturen einiger polyzyklischer Kohlenwasserstoffe mit der dazugehörigen kanzerogenen Aktivität (32).

ABBILDUNG 1

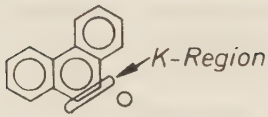
STRUKTUR UND KANZEROGENE AKTIVITÄT



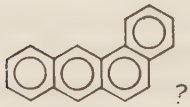
Naphthalin



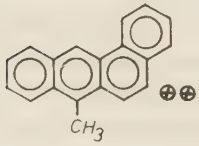
Anthracen



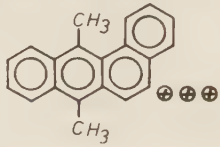
Phenanthren



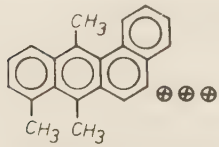
Benz(a)anthracen



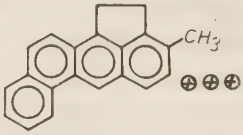
7-Methylbenz(a)anthracen



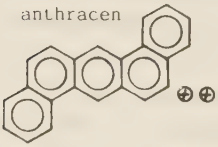
7,12-Dimethylbenz(a)anthracen



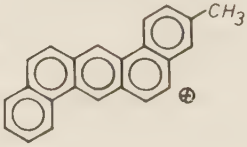
7,8,12-Trimethylbenz(a)-anthracen



3-Methylcholanthren

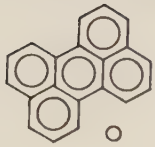


Dibenz(a,h)anthracen



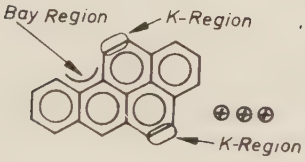
3-Methyldibenz(a,h)-anthracen

ABBILDUNG 1 (TEIL 2)



Perylen

Benzo(e)pyren



Benzo(a)pyren

Benz(a)anthracen ≙ 1,2-Benzanthracen

Dibenz(a,h)anthracen ≙ 1,2,5,6-Dibenzanthracen

Benzo(e)pyren ≙ 4,5-Benzpyren

Benzo(a)pyren ≙ 3,4-Benzpyren (früher auch 1,2-Benzpyren)

2.2 Reaktionswege einer Fremdsubstanz in der Zelle

Nicht jede Substanz, die von einer Zelle aufgenommen wird, muß auch in der Zelle wieder abgebaut werden.
Nicht jedes Molekül einer kanzerogenen Chemikalie führt zu einem Tumor . Vielmehr gibt es eine Fülle von Abbauwegen und Reparaturmechanismen, um die Zelle zu entgiften.

Abbildung 2 zeigt die Wege, die eine Fremdsubstanz nehmen kann.

REAKTIONSWEGE EINER FREMDSUBSTANZ IN DER ZELLE

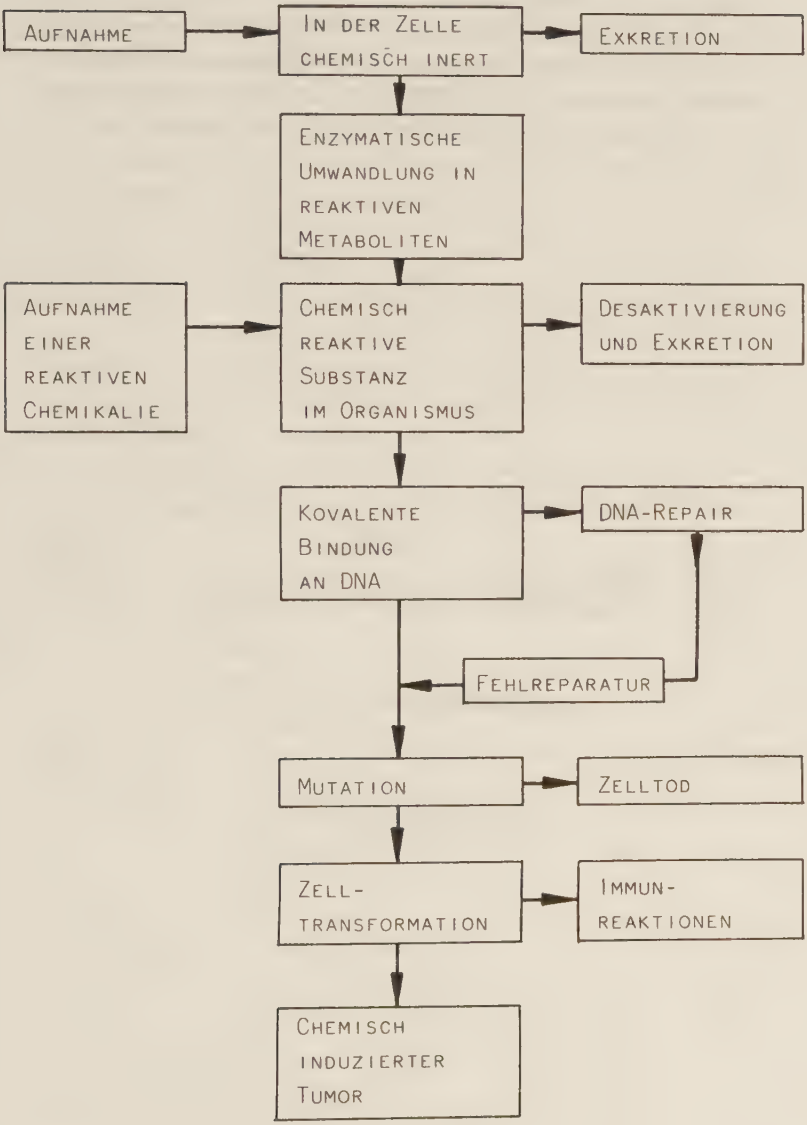


Abb. 2

Wird nun z.B. ein Aromat durch das Monooxygenasesystem der Zelle (Cytochrom P450) in ein reaktives Epoxid umgeformt, so gibt es einen ganzen Satz weiterer Enzyme, der in der Lage ist, dieses Epoxid weiter zu metabolisieren.

Epoxidhydrolasen formen das Epoxid in unreaktive trans-Dihydrodiole um, Glutathion-S-transferasen öffnen den Epoxidring, und schließlich können nichtenzymatische Reaktionen das Epoxid desaktivieren. Abbildung 3 verdeutlicht diese Reaktionswege.

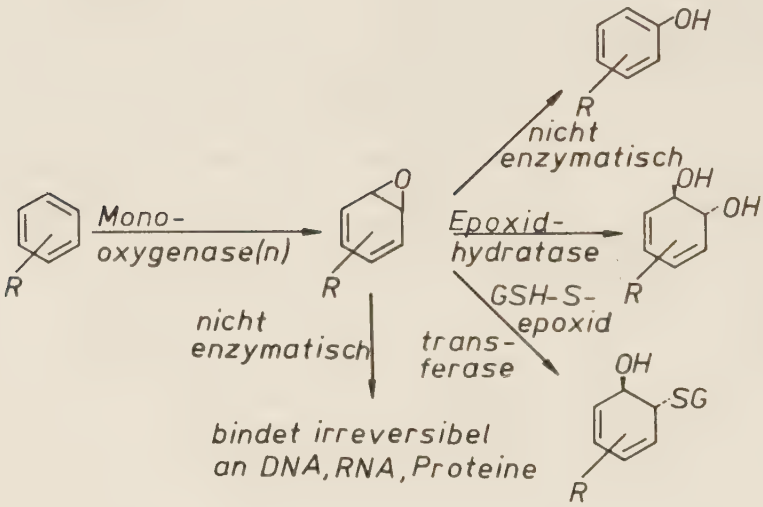


Abb. 3

Das Oxygenasesystem Cytochrom P450 ist besonders gut in der Leber untersucht, kommt aber praktisch auch in allen anderen Organen vor (33).
Dieses System ist verantwortlich für die Metabolisierun von Xenobiotika. Cytochrom P450 katalysiert eine ganze Reihe oxidativer Reaktionen wie Desalkylierungen, Epoxidierungen, Hydroxylierungen u.a. Der Enzymkomplex ist sauerstoffabhängig.
Im allgemeinen führt der oxidative Angriff bei den häufig sehr lipophilen Xenobiotika zu einer besseren Wasserslöslichkeit. Es scheint Sinn des Systems zu sein,Fremdstoffe zu entgiften und ihre Eliminierung zu erleichtern.
In einigen Fällen jedoch führt die Metabolisierung zu sehr reaktiven elektrophilen Verbindungen, die mit der DNS interagieren können und somit eine Transformation ermöglichen.
Abb. 4 zeigt einen Ausschnitt der möglichen Metabolisierungswege am Beispiel des 3,4 Benzpyrens.
Das Schema zeigt nur einen Teil des Metabolismus, da andere Metbolisierungreaktionen wie die Sulfotransferase-Reaktionen weggelassen sind.

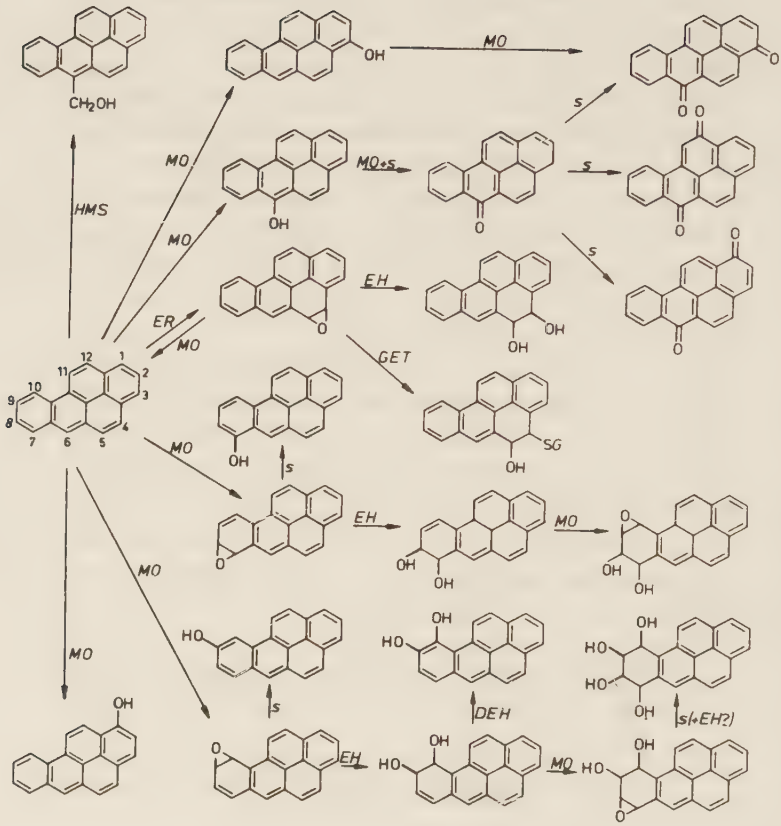


Abb. 4

DEH: Dihydrodiol Dehydrogenase; EH: Epoxid Hydrolase; ER: Epoxid Reduktase; GET: Glutathion S-Transferase; HMS: 6-Hydroxymethhyl-benzo(a)pyren Synthetase; MO: Monooxygenase; s: spontane Reaktion

Dennoch wird dieses Abbauschema äußerst kompliziert durch die Doppelrolle, die einige Enzyme spielen.
So wird 3,4-Benzpyren durch eine Monooxygenasereaktion in das reaktive 7,8-Oxid überführt. Diese reaktive Zwischenstufe wird durch Epoxid Hydrolase zum entsprechenden 7,8-Dihydrodiol desaktiviert. Dies ist nun wiederum die Vorstufe für eine weitere Monooxygenasereaktion, die erneut zu einem Epoxid führt.
Dieses "Bay-Region" Diol-Epoxid ist chemisch besonders reaktiv und hat sich als ultimates Karzinogen erwiesen (34,35,36).
Abbildung 5 verdeutlicht diese Reaktionsschritte.

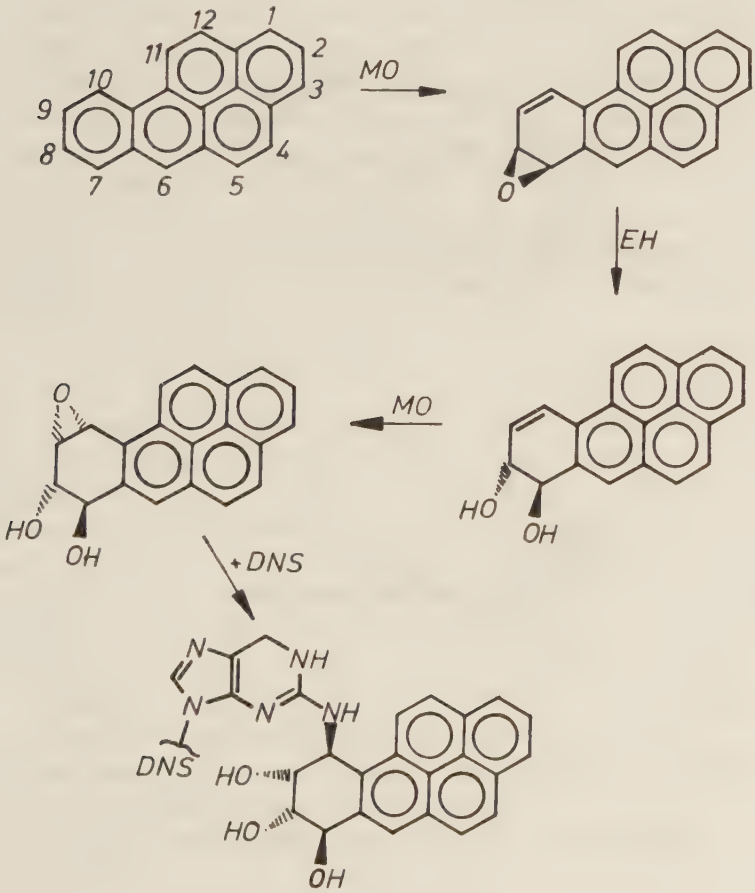


Abb. 5

Dieser Abbauweg wird inzwischen allgemein anerkannt.
Die dabei möglichen Isomere, das cis- und trans- Diolepoxid, sind inzwischen röntgenkristallografisch genaustens untersucht (37,38). Beide Isomere sind mutagen, zeigen aber bei verschiedenen Tests unterschiedliche Aktivität (39,40).
Abbildung 6 (38) zeigt die Komputerzeichnungen des 7, 8-Dihydroxy-9,10- epoxy.7,8,9,10- tetrahydrobenzpyrens in Auf- und Seitenansicht.

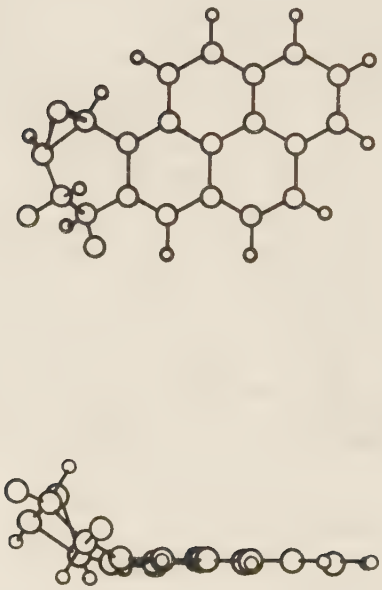


Abb. 6

2.2.1 Der "Ames Test"

Die akute Toxizität der Substanzen aus unserer Umwelt ist meist gut bekannt. Die Kenntnisse über mutagene oder carcinogen Substanzen sind dagegen oft gering. Dies liegt u.a. daran, daß sich genotoxische Schäden oft erst nach Jahren oder gar Generationen manifestieren. Ein Zusammenhang zwischen Noxe und Schaden ist häufig nicht direkt erkennbar.

Um das Risiko für den Menschen zu senken, sind präventive Maßnahmen zur Erkennung des Gefährdungspotentials unabdingbar.

Prinzipiell lassen sich solche Erkenntnisse im Tierexperiment erlangen, doch wären diese Erkenntnisse mit einem hohen Aufwand an Zeit, Arbeit und Tiermaterial verbunden.

Durch die Entwicklung einer Reihe von sogenannten Short-Term Tests ist es gelungen, bei geringerem Zeit- und Kostenaufwand Aussagen über eine eventuelle Mutagenität oder Carcinogenität einer Substanz treffen zu können.

Keiner dieser Tests läßt für sich alleine eine sichere Aussage über die Genotoxizität einer Substanz zu. Durch die Kombination geeigneter Tests läßt sich die Sicherheit einer Aussage aber wesentlich steigern.

Einer der am weitesten verbreiteten Tests ist der Ames Test (41,42).

In diesem Test werden bestimmte Mutanten des gramnegativen Bakteriums "Salmonella typhimurium" als Indikatororganismen für mutagene Substanzen verwendet. Diese Stämme haben ihre pathogenen Eigenschaften verloren. Aufgrund einer Mutation sind sie nicht mehr in der Lage, die Aminosäure Histidin zu synthetisieren. Die Bakterien sind his^- (Histidin-auxotroph) und können im Gegensatz zum Wildstamm (his^+, Histidin -prototroph) nicht mehr auf einem Minimalagar, der nur Salze und Glucose enthält, wachsen.

Das Prinzip des Tests beruht nun darauf, nach Applikation einer möglich mutagenen Verbindung die Zahl der Revertanten zu bestimmen, die auf einem histidinfreien Medium wachsen können, also wieder histidin-prototroph geworden sind.

Meistens besitzen die Stämme noch weitere Eigenschaften,

wie etwa den Verlust der Fähigkeit, die äußere Membran neu zu bilden, was die Aufnahme bestimmter Substanzen begünstigt oder den Verlust des Gens, das für die Excisionsreparatur zuständig ist.

Um auch Substanzen erfassen zu können, die erst im tierischen Organismus durch Metabolisierung ihre kanzerogen Potenz erhalten, wird dem Testansatz ein Homogenisat aus Rattenleber (Mäuseleber) zugesetzt. Diese Lebermikrosomensuspension enthält das Xenobiotika metabolisierende Sytem Cytochrom P 450.
Da dieses Homogenisat bei 9000g zentrifugiert wird, wird es sehr häufig als "S 9 - Mix" bezeichnet.
Als mutagen wird eine Substanz dann bezeichnet, wenn die Zahl der Revertanten doppelt so groß ist wie die unter Standardbedingungen (durch Zugabe von Minimalmengen an Histidin werden die Stämme am Leben gehalten, durch UV und Höhenstrahlung gibt es immer eine gewisse Anzahl an Revertanten).

2.3 Carcinogenese als Mehrstufenprozess

Neben der klassischen Methode, die rasierte Haut von Mäusen mit den Lösungen kanzerogener Substanzen zu beträufeln, um entweder nach einer großen Dosis oder mehreren kleinen Dosen Hauttumoren zu erzeugen, gibt es noch eine weitere raffinierte Methode.

Die Haut des Versuchstieres wird zunächst mit einer unterschwelligen Dosis der krebserregenden Substanz bepinselt. Dies bedeutet, daß das Tier zu Lebzeiten keinen Tumor bekommen kann.

Die so behandelten Tiere werden nun wöchentlich mit einer 1% igen azetonischen Lösung aus Crotonöl (Samenöl der Wolfsmilchpflanze "Croton tiglium L.") behandelt. Nach 10 bis 12 Wochen zeigen sich die ersten Papillome.

Crotonöl alleine ist nicht in der Lage, Papillome zu erzeugen. Dieses Experiment ist unter dem Namen "Berenblum-Experiment" (43) bekannt geworden.

Folgendes Schema soll den Versuchsablauf des Berenblum-Experiments veranschaulichen.

Versuch Nr.	Behandlung der Tiere	Tumoren
1	0 0 0 0 0	+
2	0	-
3	X X X X	-
4	0 X X X X	+

0:Initiierende Dosis z.B 3,4-Benzpyren
X:Bepinselung mit Crotonöl

Crotonöl ist ein starker Reizstoff. Es stellte sich daher die Frage, ob die Reizung des Gewebes (Hyperplasie) in ursächlichem Zusammenhang mit der Carcinogenese steht.

Die Untersuchung verschiedener reizender, aber nicht kanzerogener Substanzen zeigte, daß ein derartiger Zusammenhang nicht besteht. Einige der Reizstoffe, wie Cantharidin oder Senfgas, reduzierten sogar die Tumorentstehung, wenn sie in geringen Mengen

appliziert wurden (44).

Inzwischen sind etlich wirksame Substanzen aus Crotonöl isoliert (45). Die wirksamste Substanz wohl überhaupt ist das 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-azetat (TPA). Diese Verbindung ist nicht nur ein guter "Promotor" sondern auch ein äußerst starkes Reizmittel. Die genaue Kenntnis dieses Esters (Abb. 7) ermöglicht es, Berenblum-Experimente mit genauen quantitativen Vorgaben und auch mit sterisch modifizierten Substanzen durchzuführen.

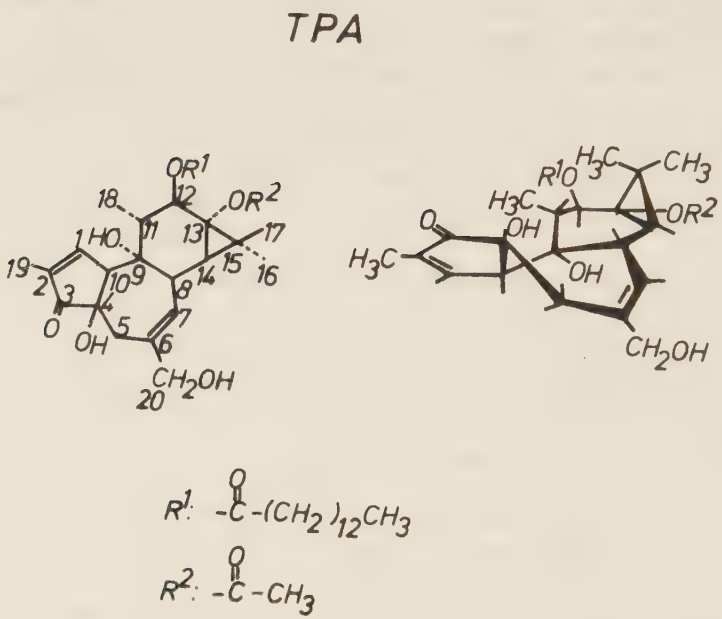


Abb.7

Zu der Reihe der synthetisch hergestellten Phorbolester gehört auch das Phorbol-di-12,13-decanoat. Dieser Ester verhält sich sehr ähnlich wie das TPA. Überraschend ist nun, daß die dazugehörige Iso-Verbindung, das Iso-phorbol-di-12, 13-decanoat (OH-Gruppe an C 4 zeigt hinter die Papierebene) als Promotor völlig unwirksam ist.

Diese Tatsache weist auf äußerst komplexe Wechselwirkungen zwischen co-carcinogener Substanz und der letztlich betroffenen Zelle hin.
Wenn solche Zusammenhänge zwischen Promotor,krebserregender Substanz und irgendwelchen Rezeptoren an der Zelle bestehen, sollte es möglich sein, sie mit geeigneten Maßnahmen feststellen zu können.

Im Falle des 3,4-Benzpyrens bietet sich, wegen seiner starken Fluoreszenz und seiner damit verknüpften guten Nachweisbarkeit, die Mikrofluorimetrie geradezu an.

2.4 Möglichkeiten der fluorimetrischen Messungen

Schon 1939 beobachtete Graffi (46) unter dem Mikroskop eine starke Fluoreszenz in Mäuse-Aszites-Zellen nach der Zugabe einer Lösung von 3,4-Benzpyren in Glycerin.

Wenige Jahre später konnte mit fluoreszenzspektroskopischen Methoden gezeigt werden, daß 3,4-Benzpyren bei "in vivo"-Versuchen an das Gewebe gebunden wird (47). Für weitere Untersuchungen, speziell in Verbindung mit der Kopplung an die DNS, war die Empfindlichkeit der Apparaturen zu gering.

Versuche mit radioaktiven Substanzen schienen lange Zeit mehr Erfolg zu versprechen.

Durch moderne Entwicklungen wie, Interferenzfilter und Gittermonochromatoren auf der optischen und Photomultiplier und Photonenzähler auf der elektronischen Seite, ist es gelungen, die Empfindlichkeit einer fluorometrischen Meßapparatur wesentlich zu steigern.

Heute ist die Empfindlichkeit eines Fotofluorometers oder eines Mikroskopfluorometers durchaus vergleichbar mit der Empfindlichkeit, wie sie bei Messungen mit radioaktiven Substanzen erreicht werden kann.

Vorteil der mikroskopfluorometrischen Messung ist, daß die Probe direkt beobachtet werden kann, und daß sie nicht zerstört wird. Die Probe bleibt für weitere Untersuchungen erhalten und kann, wenn es sich um klar ersichtliche Effekte handelt, zur Dokumentation , fotografiert werden.

Nachteil der fluorometrischen Methoden ist zunächst einmal die geringe Selektivität. Sehr ähnliche fluoreszierende Substanzen können nicht sehr leicht voneinander unterschieden werden. Dieser Nachteil läßt sich entweder durch die Wahl geeigneter Versuchsbedingungen oder durch den Einsatz modernster Technik ausgleichen.

Es ist heute eher so, daß die Empfindlichkeit der Geräte so groß ist, daß man allergrößte Sorgfalt auf die Reinigung der verwendeten Geräte und Lösungsmittel verwenden muß. Viele Spülmittel, Weichmacher, Kunststoffe und Klebstoffe fluoreszieren bei geeigneter Anregung. Wenn man bedenkt, daß auch die Linsen eines Objektives miteinander verklebt werden, ist klar, daß jeder verwendete Gegenstand auf seine Fluoreszenz untersucht werden muß.

3 Materialien und Methoden

3.1 Die Zellkultur

3.1.1 Begriffe und Definitionen

Um die für die vorliegende Arbeit notwendigen Versuche durchführen zu können wurden verschiedene Zellkutlturen angelegt.
Viele Jahre lang war der Begriff "Zellkultur" von etlichen geheimnisvollen bis mystischen Vorstellungen umgeben. Heute dient sie im Allgemeinen weniger als Selbstzweck, als vielmehr dazu, wissenschaftliche Ziele zu erreichen. Dennoch herrscht auch heute noch eine ziemliche Begriffsverwirrung bei der Beschreibung der Zellkulturen und den dazugehörigen Arbeitsmethoden.
Einige der in dieser Arbeit häufiger gebrauchten Begriffe werden hier nachfolgend im Sinne des *Committee on Terminology* der *Tissue Culture Association (TCA, USA)* (48,49) wiedergegeben.Auch in den Katalogen einiger Lieferfirmen werden diese Vorschläge der *TCA* wiedergegeben (50).

Zellkultur:

Wachstum von Zellen in vitro einschließlich der Kultur einzelner Zellen.

Explantat: Ein Stück von einem Gewebe oder Organ, das zum Anzüchten einer in vitro-Kultur entnommen wurde.

Monolayer: Eine einschichtige Zellage, die auf einer Oberfläche wächst.

Primärkultur: Die erste Kultur, die von Zellen, Geweben oder Organen unmittelbar nach der Entnahme aus einem Organismus angezüchtet wurde. Explantatkulturen von Tumoren, die nach Injektion von Kulturzellen an Versuchstieren entstanden sind, fallen nicht unter diesen Begriff. Diese werden als Fortsetzung der injizierten Zellinie bzw. des injizierten Zellstammes betrachtet. Eine Primärkultur gilt nach ihrer ersten Passage als Zellinie und nicht mehr als Primärkultur.

Zellinie: Mit der ersten Subkultur wird aus der Primärkultur eine Zellinie. Eine Zellinie besteht aus den zahlreichen Linien der verschiedenen Zellen, aus denen die Primärkultur bestand.

Etablierte Zellinie: (Auch permanente Zellinie genannt) Eine Zellinie wird als etabliert (permanent) bezeichnet, wenn man sie in vitro unbegrenzt subkultivieren kann.

Passage: Das Transferieren von Zellen aus einem Kulturgefäß in ein anderes.

Subkultur: Wird synonym mit "Passage" verwendet.

Fibroblasten: Fibroblasten sind Zellen von spindelförmiger oder unregelmäßiger Form. Sie sind verantwortlich für die Ausbildung von Fasern. In Zellkulturen können auch funktionell andere Zelltypen die Morphologie von Fibroblasten zeigen.

Fibroblastenähnliche Zellen: In Zellkulturen können die verschiedensten Zelltypen eine ähnliche Morphologie aufweisen. Zellen, die eine spindelförmige oder irreguläre Form zeigen, werden generell als "Fibroblasten" bezeichnet. Die Potenzen (z.B. Faserbildung) oder die Herkunft solcher Zellen sind jedoch für gewöhnlich unbekannt. Sie sollten deshalb als "fibroblastenähnlich" oder "fibroblastenartig" bezeichnet werden.

Epithelzellen: Die Zellen liegen eng aneinander und bilden mosaikartige Schichten mit sehr wenig Interzellularsubstanz, wie man es oft in vivo oder in Gewebe- und Organkulturen sieht.

Epithel-
ähnliche
Zellen:

Epithelzellen können in Zellkulturen verschiedene Formen annehmen. Sie neigen jedoch immer dazu, Schichten eng aneinander hängender polygonaler Zellen zu bilden. Das Ausmaß des Aneinanderhängens kann jedoch sehr variieren, so daß solche Zellen, die nur die Tendenz zeigen, aneinander zu haften, ohne die sonst typischen Zeichen von Epithelzellen zu zeigen, besser als "epithelähnlich" oder als "epithelartig" bezeichnet werden.

3.1.2. Die Zelle

Die tierische Zelle ist ein hochorganisiertes Gebilde. Sie ist von einer Membran umgeben, die je nach Zellart unterschiedlich dick sein kann. In allen Zellen gibt es eine Anzahl genau definierter Strukturen: Den Zellkern, die Mitochondrien, die Lysosomen, den Golgi-Apparat, Peroxysomen und gelegentlich Zelleinschlüsse.

Die Zellwand ist flexibel. Sie ist aufgebaut aus Mucopolysacharide, Glycolipiden und Glycoproteinen. Die Adhäsionseigenschaften der Zellwand sind zellspezifisch und spielen eine große Rolle bei der "Erkennung" der Zellen untereinander und somit bei der Gewebeorganisation. Die Plasmamembran ist die Permeabilitätsbarriere. Sie enthält Enzyme und aktive Transportsysteme für Na^+ und K^+.

Der Zellkern wird vom Zytoplasma durch eine großporige Doppelmembran abgegrenzt. Er kann sich innerhalb der lebenden Zelle frei bewegen. Im Zellkern befinden sich ein oder mehrere Nucleoli. Sie sind reich an Ribonucleinsäure (RNS) und sind der Ort der Bildung der Vorläufer der ribosomalen RNS. Der Rest des Zellkerns besteht aus einer strukturlosen, basophilen Chromatinmasse, die eine hohe Konzentration an Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Proteinen besitzt, einschließlich der basischen Proteine, den sog. Histonen.

Die Mitochondrien sind fadenförmige bis kugelige Gebilde, die von einer Doppelmembran umgeben sind. In der lebenden Zelle sind sie ständig in Bewegung. Sie haben eine Reihe innerer Einstülpungen, die man "Cristae" nennt. Die äußere und innere Membran der Mitochondrien unterscheiden sich durch ihre Lipidzusammensetzung. Die Matrix ist reich an Enzymen und enthält DNA. Die Mitochondrien sind der Ort der Oxidation der Kohlenhydrate, der Aminosäuren und der Lipide zu CO_2 und H_2O durch molekularen Sauerstoff.
An der inneren Memran befinden sich die Enzyme für den Elektronentransfer und die Energieumwandlung.

Die Lysosomen sind etwa gleich groß wie die Mitochondrien, bestehen aber aus dickwandigen Kugeln mit einer kleinen inneren Aushöhlung. Sie sind reich an abbauenden Enzymen wie Proteasen,

Ribonucleasen und Phosphatasen. Sie "verdauen" die Substanzen, die z.B. durch Phagozyten in die Zelle gebracht wurden.
Der Golgi-Apparat besteht aus flachen membranumhüllten Vesikeln, die oft zu mehreren auftreten. Einige der Vesikeln werden zu Vakuolen. Neu synthetisierte Sekretproteine sammeln sich im Golgi-Apparat.

Die Peroxysomen sind kleine von einer einfachen Membran umgebene Vesikeln. In ihnen findet man verschiedene Oxidasen.
Das Zytoplasma hat eine ausgeprägte Struktur, die aus einer mehrfach gefalteten Membran besteht, die man Endoplasmatisches Retikulum oder Ergoplasma nennt. Winzige Körnchen, die Ribosomen sind entlang der Retikulum-Fältchen verteilt. Dies sind die aus Ribonucleoprotein bestehenden Ribosomen. Sie sind für die Proteinbiosynthese wichtig. Die Falten des endoplasmatischen Retikulums sind mit einer wäßrigen Lösung aus Proteinen und Kolloiden gefüllt, dem sogenannten Zytosol.

Die DNS der Zellen wird aus 4 Nucleotiden aufgebaut. In einem Code wird die genetische Information der DNS gespeichert. In diesem Code wird jede Aminosäure durch eine Dreiergruppe von Nucleotiden wiedergegeben. Die Information der DNS wird auf RNS-Moleküle, die messenger RNS, übertragen. Die Übertragung der Information erfolgt "portionsweise". Die m-RNS verbindet sich mit den Ribosomen im Zytoplasma und dient als Matrize für die Proteinbildung. Eine andere RNS, die transfer-RNS dient als Transportmittel der Aminosäuren zu den Ribosomen.
Ribosomale RNS und t-RNS werden auch im Zellkern gebildet und zum Zytoplasma gebracht, um an der Protein-Synthese teilzunehmen.

3.1.3 Die Zellteilung

Einer der grundlegendsten Vorgänge, die für jeden, der die Zellkultur betreibt, von Interesse ist, ist die Zellteilung.

Grundsätzlich gibt es zwei normale Varianten der Zellteilung, die Meiose und die Mitose.

Die Meiose tritt bei der Bildung der Keimzellen auf. Hier wird die normale Chromosomenzahl halbiert, so daß jede Tochterzelle den halben Satz erhält.

Bei der Mitose besitzt jede Zelle im Augenblick der Teilung Material für einen doppelten Chromosomensatz.

Die Teilungsstadien der tierischen Zelle sind:

1. Die intermitotische Phase (Interphase)

Der größte Teil der neuen Stoffe wird synthetisiert. Nach Verdopplung des Zellinhaltes kommt die Zelle in die Prophase.

2. Die Prophase

Die Prophase ist das erste sichtbare Stadium der Zellteilung. Innerhalb des Zellkerns verdichtet sich das Chromatin zu langen Fäden. Das Zentrosom teilt sich und die beiden Teile wandern auseinander. Die Chromosomen ordnen sich spindelförmig an. Die Kernmembran löst sich auf.

3. Die Metaphase

Die Chromosomen liegen geordnet am Äquator der Zelle.

4. Die Anaphase

Die Chromosomen spalten sich der Länge nach auf und bewegen sich voneinander weg. Mit Beginn der zytoplasmatischen Teilung tritt die Zelle in die Telophase.

5. Die Telophase

Die Chromosomen sammeln sich und lösen sich auf. Um jede Kernzone bildet sich eine neue Kernmembran. Zwischen den beiden neuen Kernen zieht sich das Zytoplasma zusammen, bis sich die beiden neuen Zellen "abgeschnürt" haben.

Häufig findet man bei der Beschreibung des Zellzyklus auch eine andere Einteilung. Hierbei wird die Interphase in 3 Phasen eingeteilt, auf die dann die Mitosephase folgt.

Es ergibt sich folgendes Bild:

$$\ldots G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M \rightarrow G_1 \rightarrow S \rightarrow G_1 \ldots$$

Hierbei bedeutet G_1-Phase (Gap engl. Lücke, Kluft) die Ruhephase innerhalb der Interphase vor der Synthese-Phase, S -Phase, in der die DNS synthetisiert wird. M schließlich ist das Symbol für die Mitosephase, die mit der Teilung endet.

3.1.4 Zellkultur-Techniken

Es gibt heute eine ganze Menge einfach zugänglicher Arbeitsvorschriften, mit deren Hilfe man sich in die Arbeitsmethodik der Zellkultur einarbeiten kann. Kataloge (51) und Lehrbücher (52) geben Hinweise für den mit Zellkulturen arbeitenden "Praktiker".

Dennoch wird man seine Arbeitsweise immer noch den jeweiligen Gegebenheiten anpassen müssen.

Die größte Gefahr, die Zellkulturen mit tierischen Zellen droht, ist wohl die Kontamination mit Mikroorganismen wie Pilzen, Bakterien oder Algen.

Um eine Kontamination zu vermeiden, gibt es prinzipiel zwei Methoden.

1. Die Sterilisation
2. Aseptische Arbeitsweise

Verunreinigungen sind möglich durch

1. Den Operateur
2. Die Umgebung (Luft, Gebläse)
3. Die Geräte
4. Das Kulturmedium
5. Die Zellkultur

Sterilität erreicht man durch physikalische Methoden wie

Trockene Erhitzung
Autoklavierung
Bestrahlung
Filtration
Zentrifugation

oder durch chemische Methoden wie

Zusatz von Antibiotika
Begasung mit Ethylenoxid
Besprühen mit Antiseptika (Ethanol 70%)

Soweit möglich wurden die Geräte "trocken" sterilisiert (160°C, 90Min.). Hierbei wird das Sterilisationsgut in unlackiert Aluminiumdosen verpackt oder in handelsübliche Alufolie gewickelt. Es ist darauf zu achten, daß eventuell benötigte Watte (zum Stopfen der Pipetten) unbedingt aus reiner Baumwolle bestehen

muß ("Augenwatte" aus der Apotheke), da andere Watte diesen Temperaturen nicht standhält.
Proteinhaltige Lösungen wurden filtriert (Sartorius Filtriergerät SM 16267, teflonbeschichtet mit Membranfilter SM 11307, 0,2µm).

Wasser und Salzlösungen wurden autoklaviert (~2bar,~120°C, 20 Min.).

Lösungen biologischen Ursprungs (Serum) wurden steril gekauft und aseptisch weiterbehandelt.

Alle Arbeiten wurden auf einer sog. sterilen Werkbank durchgeführt, die vor und nach jeder Arbeit mit Ethanol gereinigt wurde.

Um eine ständige Kontamination des Arbeitsraumes zu vermeiden wurde die Be- und Entlüftung abgestellt. In den Arbeitspausen und über Nacht wurde das Labor mit UV-Licht bestrahlt (53).
Bei den Arbeiten mit den Kulturen oder auch mit den dazugehörigen Geräten wurden Latexhandschuhe getragen, wobei vor Beginn der Arbeiten einige Milliliter Ethanol (70%) mit den Händen verrieben wurden.
Besondere Aufmerksamkeit verdient das Wasser zum Ansetzen der Lösungen. Es kann notwendig sein, besonders wenn andere Arbeitsgruppen mit Mikroorganismen im gleichen Hause arbeiten, destilliertes Wasser nochmals langsam über Kaliumpermanganat zu destillieren und erst dann zu verwenden.
Die verwendeten Chemikalien waren alle von P.A.-Qualität
Sehr wichtig ist die Frage nach den Gefäßen, in denen man die Zellen züchten soll. Naheliegend wären Glasflaschen, doch ist zweierlei zu bedenken: Erstens könnten durch das leicht alkalische Medium mit der Zeit toxische Stoffe wie Blei oder Arsen aus dem Glas herausgelöst werden, zweitens müßte man, da nicht jede Oberfläche für die Zellkultur geeignet ist, jede Flasche einer besonderen Prozedur unterziehen. Es gibt Untersuchungen (54), die zeigen, daß die Haftfähigkeit von Zellen an Glas von der Ladungsdichte an seiner Oberfläche abhängen. Die Oberfläche muß eine negative Ladung tragen, um Natriumionen binden zu können.

Andere Untersuchungen zeigen, daß die Zellhaftung an Polystyrol mindestens ebenso gut ist wie die an Glas (55). Dies hat sich eine ganze Reihe von Herstellern nutzbar gemacht und

stellt Gewebekulturartikel aus Polystyrol her. Besonderes Interesse gilt hierbei der gleichmäßigen Oberfläche und der Herstellung der negativen Partialladungen an der Oberfläche. Die Verfahren, wie solche Oberflächen hergestellt werden, sind Firmengeheimnis.
Für diese Arbeit wurden bevorzugt Falcon® Gewebekulturflaschen verwendet. Die Kulturen wachsen in diesen Flaschen gut an, außerdem können sie beim Stapeln in den Brutschrank nicht nach vorne abkippen. Die Flaschenöffnung ist hier größer als bei anderen Herstellern, was das Pipettieren des Mediums wesentlich erleichtern kann.
Die Zeit, die eine Kulturflasche in offenem Zustand der Laboratmosphäre ausgesetzt ist, spielt, auch wenn die Arbeiten auf einer sterilen Werkbank ausgeführt werden, eine große Rolle bei der Kontamination.
Normale Meßpipetten laufen sehr langsam ab. Die Auslaufgeschwindigkeit erhöht sich wesentlich, wenn ein Stück der Pipettenspitze abgeschnitten wird. Bei dem anfallenden großen Bedarf an verschiedenen Meßpipetten wäre dies eine ziemliche Materialverschwendung.

Aus diesem Grunde wurden Pipetten angefertigt, die lediglich aus einem Glasrohr bestanden, das an dem einen Ende leicht spitz zuläuft und auf das am anderen Ende ein kurzes Stück enges Glasrohr aufgesetzt ist, was ein Stopfen der Pipette ermöglicht.
Das gewünschte Volumen wird mit einem Diamantschreiber angezeichnet. Die Dicke und Länge der Glasrohre wurde so gewählt, daß die jeweilige Pipette auch noch für ein zweites Volumen geeignet war. So ergaben sich folgend Pipettengrößen: 5/10ml, 9/18ml, 20/30ml und 50ml. Diese Pipetten haben sich ausgezeichnet bewährt.

Zellen wachsen in Kultur vermutlich dann am Besten, wenn die vorliegenden Bedingungen den In vivo-Bedingungen am nächsten kommen.
Großen Einfluß haben mit Sicherheit eine große Anzahl organischer und anorganischer Substanzen, gelöste Gase (Sauerstoff und CO_2), der pH-Wert, der osmotische Druck und nicht zuletzt die Temperatur.
Säugetierzellen sind gegen Temperaturschwankungen sehr empfindlich. Die Temperatur von 37°C sollte nicht wesentlich überschritten werden. Allerdings hat sich auch gezeigt, daß die Zellen Temperaturen von 20-25°C einige Tage schadlos überstehen können.
Sauerstoff und CO_2 sind für das Überleben der Zellen notwendig. Als Erfahrungswert hat sich ein Luftgemisch mit 5% CO_2-Anteil bewährt.
Diese Kulturbedingungen, Temperaturkonstanz und genau definierte Gaszusammensetzung lassen sich relativ leicht in einem geeigneten Brutschrank (Heraeus EKCO_2) herstellen. Der Brutschrank-Innenraum sollte möglichst aus rostfreiem Edelstahl gefertigt sein, um eine leichte Reinigung und Desinfektion zu ermöglichen. Außerdem muß eine geeignete Vorrichtung vorhanden sein, um im Brutschrankinnenraum für die benötigte hohe Luftfeuchtigkeit zu sorgen (bei dem benutzten Gerät eine Wanne mit ca. 10ℓ Fassungsvermögen).
Schwieriger ist es schon, die anderen Bedingungen alle richtig zu erfüllen, das heißt ein geeignetes Medium für die jeweilige Zellkultur zu finden.
Es gibt eine ganze Reihe von Medien natürlichen oder synthetischen Ursprungs, oder auch Gemische aus beiden (52).
Als Grundlage für alle Medien dient eine synthetische Mischung aus anorganischen Salzen. Diese gepufferten Lösungen werden oft auch als "BSS" (Balanced Salt Solution) bezeichnet.
Viele Medien sind für ganz spezielle Zwecke oder für ganz spezielle Zellen entwickelt worden. Es wurde daher von vornherein nach einem Medium gesucht, das es ermöglichen, sollte verschiedene Zellarten auch unter schwierigen Bedingungen zu züchten.

Ein Medium, das diese Anforderungen erfüllt, ist HAM's F12 mit 12% Serumzusatz (52,56,57).
Dieses Medium ist geeignet für die Auzucht verschiedener Zelltypen und ermöglicht gleichzeitig auch die Anlage von Primärkulturen, selbst wenn nur wenige Zellen zur Verfügung stehen.
Da die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe des Mediums F12 durch Modifikationen, wie z.B. Hydrochloride statt Reinsubstanzen, leicht variieren kann, wird die Zusammensetzung des benutzten Mediums F12 in einer Tabelle aufgeführt. (Tabelle 1)

HAM's F-12 Mediumzusammensetzung (Mengen in mg/l)

Anorganische Salze

NaCl	7599,00000
KCl	223,60000
Na_2HPO_4	142,00000
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	44,00000
$MgCl_2 \cdot 6H_2H$	122,00000
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,83400
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,00249
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,86300

Aminosäuren

L-Alanin	9,00000
L-Arginin•HCl	211,00000
L-Asparagin	13,20000
L-Asparaginsäure	13,30000
L-Cystein•HCL	31,50000
L-Glutamin	146,00000
L-Glutaminsäure	14,70000
Glycin	7,50000
L-Histidin•HCl•H_2O	21,00000
L-Isoleucin	4,00000
L-Leucin	13,00000
L-Lysin•HCl	36,50000
L-Methionin	4,47000
L-Phenylalanin	5,00000
L-Prolin	34,50000
L-Serin	10,50000
L-Threonin	12,00000
L-Tryptophan	2,00000
L-Tyrosin	5,40000
L-Valin	11,70000

Tabelle

HAM's F-12 Mediumzusammensetzung Fortsetzung
(Mengen in mg/l)

Vitamine

D-Biotin	0,00730
Ca-D(+)-Pantothenat	0,47600
Cholinchlorid	13,96000
Folsäure	1,32400
meso-Inosit	18,02000
Nicotinsäureamid	0,03700
Pyridoxin•HCl	0,06200
Riboflavin	0,03800
Thiamin•HCl	0,33700
Vitamin B12	1,35700

Sonstige Substanzen

D(+)-Glucose•H_2O	1981,70000
Hypoxanthin	4,08000
Linolsäure	0,08400
DL-a-Liponsäure	0,20630
Na-Pyruvat	110,10000
Putrescin	0,16110
Phenolrot, Na	1,24000
Thymidin	0,72660

Tabelle 1

Wie viele andere Medien auch kann man heute HAM's F12 in Pulverform abgepackt kaufen. Dieses Pulver muß dann nur noch in der richtigen Menge doppelt destillierten Wassers aufgelöst werden.

HERSTELLUNG DES KULTURMEDIUMS

Benötigte Substanzen für 830ml fertiges Kulturmedium:

Aqua bi-dest autoklaviert	630ml
HAM's F12 Medium	
10-fach konzentriert	
steril filtriert	83ml
Fötales Kälberserum	100ml
7,5% $NaHCO_3$ Lösung	
steril filtriert	8ml max
Antibiotika	
(Penicillin/Streptomycin	
Fungizone)	8,3ml

Herstellung des Mediums F12:
Die Trockensubstanz wird in 1/10 des auf der Packung angegebenen Volumens Aqua bi-dest gelöst. Geeignete Temperatur 30°C-37°C. Danach wird sofort unter der Clean-Bench mit dem vorher autoklavierten Filtrationsgerät in eine sterile Flasche filtriert. Der zur Filtration nötige Druck wird von einer Membranpumpe erzeugt. Der Druck sollte nicht wesentlich höher als 2bar liegen, da sonst der Filter zerstört werden könnte. Dieses Konzentrat kann im Kühlschrank gelagert werden.

Herstellung des Kulturmediums:
In die mit 630ml Aqua bi-dest autoklavierten und abgekühlten Flaschen gibt man je Flasche: 83ml des sterilen HAM's F12 Konzentrats, 100ml fötales Kälberserum, max 8ml steril-filtrierte 7,5% $NaHCO_3$-Lösung (* bis zu Farbumschlag pH= 7,2-7,4), 8,3ml Antibiotika-Lösung**.
Alle Arbeiten unter der Clean-Bench. Mit sterilen ("üblichen") Pipetten arbeiten.

* Durch den Zusatz von Phenolrot in HAM's F12 kann der richtige Farbumschlag vorher mit einer Vergleichslösung und einem pH-Meter bestimmt werden. Nach einiger Übung ist der richtige Farbton leicht wiedererkennbar. Das $NaHCO_3$ bildet zusammen mit dem CO_2 der Gasphase (5%) ein Puffersystem.

** Die Konzentration an Penicillin und Streptomycin soll 100U/ml betragen.
Der Antibiotika-Zusatz dient keinesfalls zur Beseitigung schon vorhandener Kontamination. Er soll die Maßnahmen zur Verhinderung einer Kontamination unterstützen.

Aus jeder Flasche mit fertigem Medium wird eine Probe entnommen und mindestens eine Woche lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Erst nach dieser Kontrolle darf das Medium benutzt werden. Fertiges Medium ist im Gefrierschrank mehrere Monate lagerfähig.

3.1.4.1 Die Passage

Die meisten Zellen teilen sich in einem Gefäß gegebener Größe bis zur Erreichung einer Maximalzahl. Dann hören sie auf zu wachsen. Bei Mediumzufuhr können sie noch eine Weile gesund weiterleben, beginnen dann aber sich von der Gefäßoberfläche abzulösen und sterben ab.

Sind die Zellen zu einer Schicht (Monolayer) ausgewachsen, sollen sie umgesetzt werden. Man macht eine Passage. Hierzu müssen die Zellen von der Gefäßoberfläche abgelöst, in Suspesion gebracht und auf neue Kulturflaschen verteilt werden.
Prinzipiell gibt es zwei Verfahren, die Zellen von der Oberfläche abzulösen:
1. Mechanisch
2. Chemisch

Die Mechanische Methode (Schütteln und Kratzen) bietet einige Nachteile wie erhöhte Kontaminationsgefahr und Zellzerstörung.

Chemisch lassen sich die Zellen entweder durch proteolytische Enzyme oder durch Chelatkomplexbildner ablösen. Die Wirkung des Chelatbildners EDTA (Titriplex®,Versen®) beruht darauf, Calcium- und Magnesiumionen zu binden, was besonders bei Epithelzellen dazu führt, daß sie sich abrunden und schließlich ablösen. Aber auch das meist benutzte Enzym, Trypsin, zeigt nicht bei allen Zellarten eine zufriedenstellende Wirkung.
Aus diesem Grunde wurde eine Kombination aus den beiden letztgenannten Verfahren gewählt.
Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der Lösung.

Herstellung der Trypsin-Lösung

Für 1 Liter Trypsin-Lösung werden benötigt:

Lösung I

NaCl	8000mg
KCl	200mg
KH_2PO_4	200mg
Na_2HPO_4	1150mg
EDTA	1250mg
Trypsin	1250mg

Lösung II

$CaCl_2 \cdot H_2O$	100mg
$MgSO_4$	100mg

Tabelle: 2

Die Substanzen aus I und II werden getrennt gelöst, die Lösungen werden vereinigt und dann auf das richtige Volumen aufgefüllt. Danach wird die fertige Lösung steril filtriert.

Der pH-Wert der Lösung sollte möglichst bei 7,4 liegen. Unter pH-Wert 7 ist Trypsin praktisch unwirksam, ab pH= 8 werden die Zellen zu sehr geschädigt. EDTA ist in saurer Lösung schwer, in alklischer Lösung aber gut löslich.

3.1.4.2 Die Züchtung und Handhabung von Zellkulturen

Bei der Handhabung von Zellkulturen ist es unvermeidlich, häufig Lösungen auszutauschen und zu erneuern. Das benutzte Medium ist aber ein hervorragender Nährboden für alle möglichen Mikroorganismen. Jeder Tropfen verschüttetes Medium muß sofort, auch bei laufenden Arbeiten, beseitigt werden. Die betroffene Stelle muß umgehend mit Ethanol gereinigt werden.

Die Gefahren der Kontamination durch das Gießen der Lösungen lassen sich wesentlich verringern, wenn man die Lösungen nicht ausgießt, sonder absaugt.
Zu diesem Zweck wurde eine Apparatur aufgebaut, die das Arbeiten auch noch wesentlich erleichterte.
Eine Membranpumpe erzeugt das Vacuum, durch das das Medium in einen 3-Liter Erlenmeyerkolben gesaugt wird. Zum Schutz der Pumpe ist noch eine Waschflasche und ein Wattefilter zwischengeschaltet.

Man lockert den Verschluß des Gefäßes, aus dem die Flüssigkeit abgesaugt werden soll, nimmt den Verschluß aber noch nicht ab. Eine sterile Pasteurpipette wird durch die Bunsenbrennerflamme gezogen, wobei die Spitze etwa 1-2cm lang leicht abknicken soll. Diese Pipette wird nun auf den Silikonschlauch gesteckt, der zu dem Erlenmeyerkolben führt. Nun wird die Pumpe in Betrieb gesetzt. Mit einer Hand wird nun das Gefäß geöffnet, wobei der Verschluß nicht aus der Hand gelegt wird. Die Verschlußinnenseite soll nach unten zeigen. Mit der anderen Hand kann man nun vorsichtig, ohne den Zellrasen zu beschädigen, die Flüssigkeit absaugen. Ein Fußschalter, der die Pumpe startet und stoppt, erleichtert die Arbeit wesentlich.
Nach Beendigung der Arbeit müssen alle Teile mit Ethanol gesäubert werden. Auch durch den Silikonschlauch sollen einige Milliliter Ethanol gesaugt werden.
Der Erlenmeyerkolben braucht nicht jedesmal geleert zu werden, dies ist erst notwendig, wenn seine Füllhöhe einen kritischen Stand erreicht hat.

3.1.4.3. Der Aufbau der Zellkultur

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten eine Zellkultur zu bekommen. 1. Man kauft eine angezüchtete Kultur oder
2. Man stellt sich eine Zellsuspension aus frischem Gewebe selbst her und züchtet dann an.

Die Behandlung gekaufter Kulturen

Es gibt eine Reihe von Firmen, die angezüchtete Kulturen liefern (Biochrom, Flow). Viele Zellinien sind heute weit verbreitet. Es ist aber möglich, daß einige der in den Laboratorien gehaltenen Zellinien nicht mehr dem Originaltyp entsprechen.
Seit 1964 hat die *American Type Culture Collection Cell Repository* eine Sammlung von Zellinien angelegt, die sehr genau untersucht wurden. Diese Zellen sind frei von Verunreinigungen mit Mikroorganismen. Außer ihrer sonstigen Bezeichnung haben diese Zellinien noch eine "CCL"-Nummer (Certified Cell Line) (58).
Einige dieser Zellinien kann man auch über die o.a. Firmen beziehen.

Gewöhnlich werden die Zellen in gut isolierendem Material so verschickt, daß sie auf schnellstem Wege beim Empfänger ankommen. Die Flaschen sind vollständig mit Medium gefüllt und sorgfältig hermetisch verschlossen.
Zuerst wird optisch (Phasenkontrastmokroskop) überprüft, ob die Zellen in gutem Zustand sind und sich schon ein schöner Zellrasen ausgebildet hat(Monolayer). Danach wird die Flasche sorgfältig außen mit Ethanol greinigt. Nach dem Öffnen der Flasche wird nun der größte Teil des Mediums wie oben beschrieben abgesaugt. In einer Flasche mit 25cm² Kulturfläche verbleiben etwa 10ml Medium. Nun wird die Flasche wieder verschlossen, in den Brutschrank gelegt und nun der Verschluß wieder ein halbe Umdrehung geöffnet, damit der Gasaustausch stattfinden kann.
Nach etwa 24 Stunden wird das Medium vollständig entfernt und durch 9-10ml neues Medium ersetzt.
Probleme ergeben sich in diesem Fall dadurch, daß während des Transports der Zellen Medium aus den Flaschen austreten kann.

Da diese Art von Verunreinigung ein idealer Nährboden für viele Mikroorganismen ist, müssen die Flaschen mit größter Sorgfalt gereinigt werden.

Herstellung von primären Kulturen aus tierischen Geweben

Für Vorversuche und um etwa typisches Verhalten von primären Zellkulturen zu beobachten, wurden diese aus frischem tierischen Gewebe gezüchtet.

Sehr gut gelang diese Anzucht aus Organen von Mäusen, die erst wenige Tage alt waren.
Das Tier wird getötet und dann sorgfältig mit 70% Ethanol gereinigt. Danach wird das Tier auf einer sterilen Wachsplatte fixiert. Die Haut wird eingeschnitten, um Zugang zu den gewünschten Organen zu bekommen. Mit einem zweiten Satz steriler Instrumente werden die benötigten Organe entnommen. Die Organe werden in sterile Petrischalen gelegt, mit Medium gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung mit Mediumbedeckt.
Jedes Organ wird in möglichst kleine Stücke zerschnitten und diese Stücke werden wiederum gewaschen.
Nun werden die Gewebeteile mit der o.a. Trypsinlösung gewaschen. Hierauf wird das Gewebe reichlich mit Trypsin bedeckt und bei 37°C 30 Minuten lang gerührt, um eventuell vorhandene rote Blutkörperchen zu entfernen. Nach dem Absetzen des Gewebes wird der Überstand verworfen. Hierauf wird erneut Trypsin zugegeben und erneut bei 37°C etwa 30-40 Minuten lang gerührt. Der Überstand wird aber jetzt in ein Zentrifugenröhrchen gegossen. Sollte sich das Gewebe noch nicht vollständig aufgelöst haben, kann der Trypsinierungsvorgang wiederholt werden. Die Zellsuspensionen werden 10 Minuten lang bei etwa 200g zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und die Zellen in Medium suspendiert. Die Zellsuspension wird in geeignete Gefäße überführt und bei 37°C, 5% CO_2 95% Luft bebrütet.
Da die Organe so junger Mäuse entsprechend klein sind, ist auch die Zellausbeute gering. Die Niere etwa hat die Größe eines Stecknadelkopfes. Daher ist nach der Zentrifugation auch kein deut-

licher Niederschlg zu sehen. Dennoch kann man nach etwa einer Woche unter dem Mikroskop etliche Zellkolonien erkennen.

TRYPSINIEREN VON MONOLAYER-KULTUREN

Sind die Zellen zu einem dichten Zellrasen zusammengewachsen, sollten sie wieder "verdünnt" werden.
Hiezu wird das Medium wie beschrieben von der Flasche abgesaugt. Nun gibt man (für eine 25cm²-Flasche) 3-5ml Trypsinlösung zu. Durch sanfte Bewegungen wird die Lösung überall über der Zellschicht verteilt. Jetzt wird die Trypsinlösung abgesaugt. Die Flasche mit den Zellen kommt wieder in den Brutschrank. Sie muß häufig mit dem Mikroskop beobachtet werden, um zu sehen, wann die Zellen Kugelform angenommen haben und beginnen sich abzulösen. Dieser Zustand ist nach etwa 5 Minuten erreicht. Nach einiger Erfahrung kann man auch im Gegenlicht sehen, wann die Zellen beginnen sich abzulösen. Auf die Kontrolle sollte man dennoch nicht verzichten. Haben die Zellen sich abgelöst, werden sie in der Flasche (25cm²,50cm³) in 30ml Medium suspendiert. 20ml dieser Suspension werden nun auf 2 neue Kulturflaschen verteilt, so daß nunmehr 3 Flaschen mit je 10ml Zellsuspension vorhanden sind.
Dieser Vorgang heißt "Passage" und wird auf jeder Flasche mit zugehörigem Datum markiert. Auch für die ursprüngliche Flasche zählt dieser Vorgang als Passage.

MEDIUMWECHSEL

Normalerweise benötigen die Zellen einmal wöchentlich eine Passage. Mit höherer Passagenzahl ist dies nicht mehr in allen Fällen notwendig. In diesen Fällen soll aber dann das alte Medium durch neues ersetzt werden, um die Ernährung der Zellen zu sichern und auch um einer eventuellen Kontamination vorzubeugen. Die Haltbarkeit der Antibiotika-Lösung beträgt bei 37°C etwa 3 Tage.

Zelltypen

Der Zeitraum zwischen zwei notwendigen Passagen gilt für Mäusezellen und menschlichen embryonale Zellen, die hier verwendet wurden. Erheblich kürzer war der Abstand bei den verwendeten etablierten Zellinien *ATCC CCL 88 Tb 1 Lu (NBL-12)* und *ATCC CCL 61 CHO-K1*. Die erste Zellinie benötigt eine Passage nach etwa 4 Tagen, die aber auch bis auf den Zeitraum einer Woche ausgedehnt werden kann. Es sind Zellen einer Fledermauslunge, Epithelzellen.
Die zweite Linie stammt aus dem Ovarium eines Chinesischen Hamsters, auch dies sind Epithelzellen. Hier jedoch kann auf eine Passage jeden zweiten Tag nicht verzichtet werden. Die Zellen vermehren sich innerhalb von 7 Tagen auf das 15-20 fache(58).
Alle verwendeten Zellinien zeigen unter dem Mikroskop ihr typisches Erscheinungsbild, sind aber zum Teil sehr schwer zu fotografieren. Nachfolgende Bilder sind mit dem Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) aufgenommen.

Bild 1: Epithelzellen der Linie CCL 61 CHOK1
Bild 2: " " " "
Bild 3: Epithelzellen der Linie CCL 88 Tb 1 Lu (NBL-12)
Bild 4: Confluente Monolayer menschlicher Fibroblasten GM 3349
Bild 5: Fibroblastenähnliche confluente Monolayer menschlich, embryonal, Lunge
Bild 6: Fibroblastenähnliche confluente Monolayer menschlich, embryonal,Haut
Bilder 7 & 8: Bakterien, die sich auch bei sorgfältigster Arbeitsweise nicht vollständig von den Kulturen fernhalten lassen

Bild 1

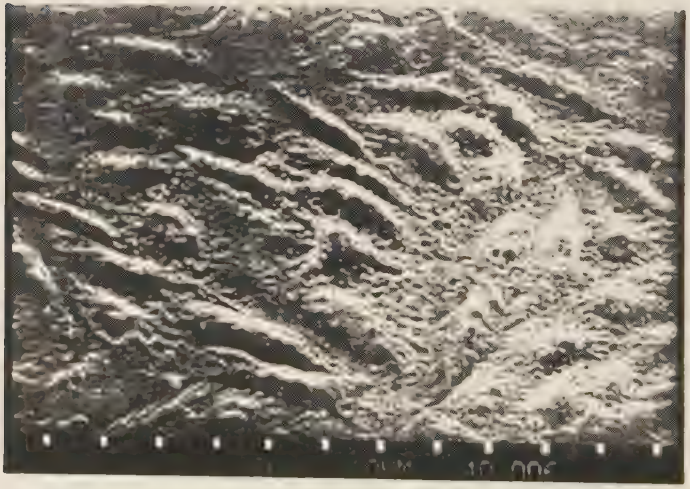


Bild 2

Bild 3

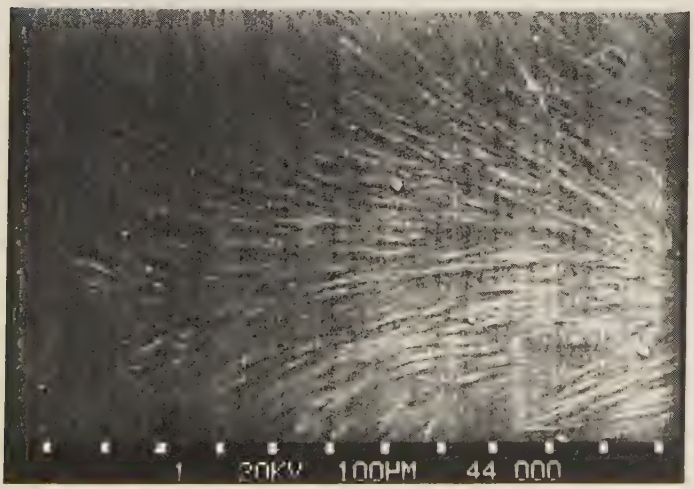


Bild 4

Bild 5

Bild 6

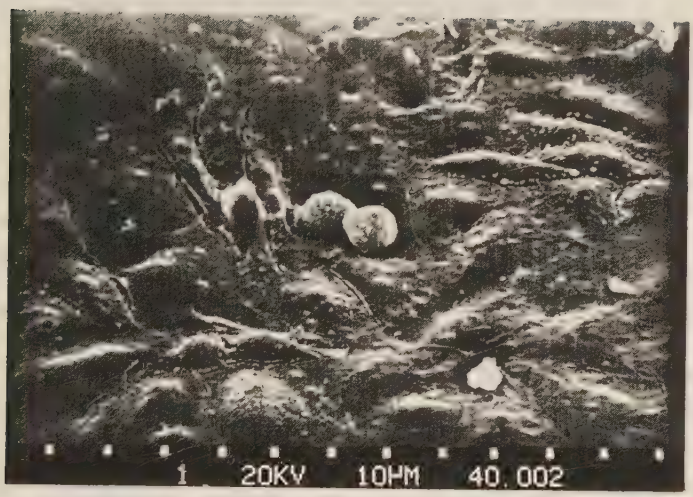


Bild 7

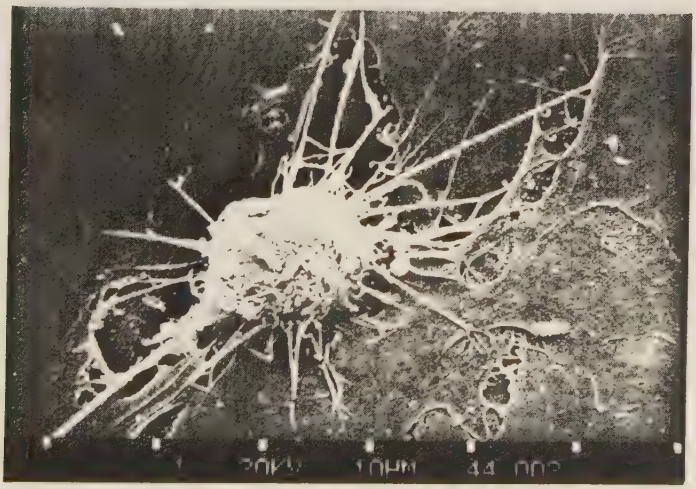


Bild 8

Kontamination mit PPLO (Mycoplasma)

Die meisten Kontaminationsmöglichkeiten, die eine Zellkultur treffen können sind zwar sehr übel und haben in der Regel zur Folge, daß die Kultur vernichtet werden muß, aber man kann die Kontamination wenigstens sehen. Anzeichen können z.B. sein, daß sich das Medium im Brutschrank verfärbt, oder daß sich die Lösung trübt. Die mikroskopische Untersuchung bestätigt dann den Verdacht auf Verunreinigung mit Mikroorganismen.

Anders als bei den meisten Bakterien wird bei den PPLO die äußere Form nicht durch eine Zellwand bestimmt. Die Zellwand fehlt bei diesen Organismen, daher sind sie stark polymorph.

Der Name PPLO (pleuro-pneumonia-like organisms) leitet sich ab vom Erreger der Pleuropneumonie der Rinder.
Besonders heimtückisch an dieser Kontamination ist, daß sie durch das Mikroskop normalerweise nicht entdeckt werden kann. Das Verhalten der Zellen wird geändert. Da sich diese Organismen durch den Membranfilter saugen lassen, bringt eine Sterilfiltration keine Abhilfe. Die PPLO bilden spiegeleiförmige Kolonien.
Durch das Aussehen dieser Kolonien sind sie verbunden mit sogenannten L-Formen (L für "Lister"-Institut, London). L-Formen von Bakterien können sich z.B. unter Einwirkung von Penicillin bilden. Auch diese Bakterien bilden spiegeleiförmige Kolonien, sind polymorph und nicht filtrierbar(59)

Dennoch gibt es einen einfachen cytochemischen Nachweis für Mycolpasma.

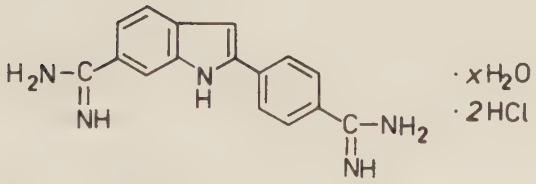
Der Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) bindet sich selektiv an die DNS und bildet stark fluoreszierende DNS-DAPI-Komplexe. DAPI (Abb. 8) besitzt ein spezifisches Bindungsvermögen für Adenin-Thymin-reiche DNS.

Der Test ist schnell (etwa 30 Minuten) und einfach durchzuführen.
Die zu prüfende Kultur wird zu etwa 50% in einer Petrischale angezüchtet. Das Medium wird abgegossen und nun die Kultur einmal mit PBS (phosphate buffered saline , Dulbecco") (Tabelle 3) gewaschen. Das Präparat wird mit mit DAPI-Lösung (0,1µg/ml in PBS) bedeckt und 15 Minuten lang im Brutschrank bebrütet. Danach

wird die Lösung abgegossen und das Präparat sofort fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Jede Fluoreszenz außerhalb der Zellkerne weißt auf DNS und damit auf Kontamination hin(60).

Abb. 8

4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)



Benötigte Substanzen für 1 Liter PBS in Gramm

NaCl	8,00
KCl	0,20
$CaCl_2$	0,10
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0,10
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	1,15
KH_2PO_4	0,20

Tabelle 3

Deckglas-Gewebe-Kulturkammern

Die verwendeten Kulturflschen erlauben eine direkte Durchmusterung der Zellen unter dem Mikroskop. Das Bild ist schlierenfrei und bis zu einer Vergrößerung von etwa 200-fach ergeben sich kaum Probleme. Eine stärkere Vergrößerung, wie sie zu der Untersuchung einzelner Zellen notwendig ist, ist dagegen nur sehr schwer und mit schlechter Qualität durchführbar. Die Objektive der Mikroskope sind auf ganz bestimmte Deckglasstärken und Brechungsindices eingestellt. So ist schon die Wandstärke der Flaschen zu groß um gute mikroskopische Ergebnisse bei starker Vergrößerung erhalten zu können.
Es gibt eine Reihe von Deckglaskulturkammern, die einwandfreie optische Qualität mit leichter Handhabung verbinden wollen.

Die erste hier verwendete Deckglaskammer war die Kammer nach *SYKES-MOORE* (61). Die Kammer besteht im Prinzip aus zwei runden Deckgläsern und einem Silikonring dazwischen. Die Deckgläser werden in einen passenden Metallring gelegt und mit einem zweiten Ring fest aufeinander geschraubt. Durch den Silikonring hat die Kultur keinen Kontakt mit Metall. Mediumwechel und andere Arbeiten werden durch Löcher in dem Metallring ermöglicht, so daß von außen mit einer Kanüle Der Silikonring durchstoßen werden kann.
Diese Kammer muß immer montiert sterilisiert werden. Der Austausch von Lösungen erfordert außerordentliches Fingerspitzengefühl, da man nur dann Lösung nachfüllen kann, wenn gleichzeitig alte Lösung abgesaugt wird. Ein Verstopfen der absaugenden Kanüle kann leicht dazu führen, daß mit der füllenden Kanüle der Druck in der Kammer zu sehr erhöht wird. Die Kammer wird zerstört.
Es gelang auch nicht, in der für Serienversuche notwendigen Anzahl, Zellkulturen in diesen Kammern zu halten.
Immer wieder sind Zellen nicht in diesen Kammern angewachsen. Materialien und Reinigungsverfahren wurden mit geringem Erfolg gewechselt. Vermulich ist aber der unzureichende Gasaustausch zwischen Brutschrankatmosphäre und Deckglaskammer mit für das schlechte Zellwachstum verantwortlich.

Eine andere Deckglas-Gewebe-Kulturkammer wurde von *Cruickshank, Cooper und Conran* (62) entwickelt. Diese Kammer kann heute über den Fachhandel (63) als Einwegartikel bezogen werden. Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung dieser Kammer.

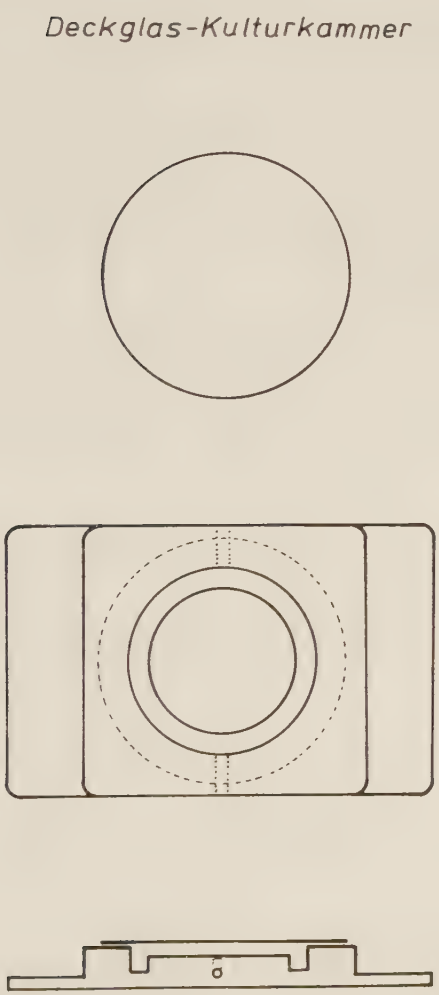


Abb. 9

Die Materialien für diese Kammer sind Polystyrol, Glas und Bienenwachs. Mit Hilfe eines Stempels aus Edelstahl wird ein Ring aus Bienenwachs auf den Polystyrolkörper aufgetragen. Das Deckglas wird, nachdem es durch die Bunsenbrennerflamme gezogen wurde, auf diesen Wachsring gelegt. Mit einem erwärmten Stempel lassen sich nun Kammer und Deckglas gut miteinander verbinden, indem man den Stempel einige Sekunden lang auf das Deckglas stellt.
Alle Arbeiten werden selbstverständlich unter der Clean-Bench durchgeführt. Da die Polystyrolkörper steril verpackt geliefert werden und zur Aufbringung des Bienenwachses der Edelstahlstempel ständig in der Brennerflamme erwärmt werden muß, ist die fertige Kammer steril. Durch die seitlich angebrachten Bohrungen kann nun Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Kammeroberfläche eingebracht werden.
Normalerweise werden die Kammern mit dem Deckglas nach unten im Brutschrank bebrütet, so daß die Zellen auf dem Glas anwachsen.
Der zwischen Glas und Polystyrol hängende Tropfen aus Medium benetzt jeweils eine Fläche von ca. 2,4cm². Das Volumen des Tropfens ist 0,2ml.
Vorteile dieser Kammer sind, daß sie leicht zu montieren ist, daß sie überraschend stabil ist und daß sie allen optischen Anforderungen entsprechen kann.

Wenn die Kammer erst einmal gefüllt ist, kann man sie ohne besondere Vorsicht herumtragen. Der Mediumtropfen verändert, wie Vorversuche gezeigt haben, seine Lage selbst bei unsanften Stößen nicht.

Bei Bedarf kann auch statt des normalen Deckglases ein Quarzdeckglas verwendet werden.

Mit etwas Geschick kann das Deckglas mit dem Zellrasen für Präparationszwecke oder weitere Untersuchungen (PPLO) wieder von der Kammer abgenommen werden.

Die ganze Kammer wird nach Gebrauch fachgerecht vernichtet. Eventuell gefährliche Reinigungsarbeiten entfallen.

Der risikoreichste Arbeitsvorgang ist auch bei dieser Kammer das Befüllen oder der Lösungsaustausch. Hierzu werden Spritzen mit sehr dünnen Kanülen (Durchmesser ≤ 0,6mm)

benötigt. Speziell beim Absaugen muß man mit der Kanülenspitze bis in den kleinen Zwischenraum zwischen Kammer und Deckglas eindringen. Hierbei ist es sehr leicht möglich, daß man die Spritze verkantet und damit das Deckglas ablöst.

3.2 Grundlagen der Lumineszenz

3.2.1 Licht und seine Wechselwirkung mit Materie

Wenn Licht auf Materie einwirkt, so kann es entweder ungehindert durch diese Materie hindurchdringen, oder es wird ganz oder teilweise absorbiert.
Wird Licht absorbiert, so treten Photonen in Wechselwirkung mit Elektronen.
Es ist nicht gleichgültig, mit welcher Art von Elektronen diese Photonen in Wechselwirkung treten.
Wechselwirken freie Elektronen, also solche, die keinen Quantenbedingungen unterliegen, mit Photonen, so wird sich die kinetische Energie der Elektronen um den Betrag erhöhen, um den die Energie der Photonen abnimmt (Compton-Effekt).
Die Valenzelektronen von Elementen unterliegen Quantenbedingungen. Sie können ihre Energie nur um ganz bestimmte Beträge ändern. Eine Wechselwirkung kann jetzt nur stattfinden, wenn die Energie eines Photons exakt mit solch einem Betrag identisch ist. Nun wird das Photon absorbiert, seine Energie wird Null.
Dieser Absorptionsvorgang liegt den Linien mit sehr kleiner Halbwertsbreite in den Linienspektren zugrunde.
Anders sind die Absorptionsvorgänge in einem Molekül.
Bei Molekülen dürfen die Schwingungsbewegungen der Kerne und die damit verbundene Energie nicht vernachlässigt werden. Außerdem führen die Moleküle gequantelte Rotationsbewegungen durch. Diese Energieen müssen der elektronischen Energie hinzuaddiert werden. Im Gegensatz zum Atom liegen im Molekül außer den elektronischen auch noch "vibronische Terme" (in der Gasphase überdies noch "Rotationsterme") vor.

Unabhängig von seiner Bahnbewegung besitzt das Elektron noch einen Drehimpuls, den Spin. Dieser Spin kann sich nur in zueinander entgegengesetzten Richtungen einstellen, denen die Spinquantenzahlen $s = \pm \frac{1}{2}$ entsprechen.
Das Pauli-Prinzip fordert, daß sich zwei Elektronen des gleichen Systems in mindestens einer Quantenzahl unterscheiden müssen.

Im gleichen Bahnzustand müssen sie also unterschiedliche Spinquantenzahlen haben. Aus solch einer Paarung resultiert kein Gesamtspin, da sich die Spinmomente gegenseitig aufheben.
Aus dem resultierenden Spinmoment mehrerer Elektronen ergibt sich die Multiplizität M.

$$M = 2S + 1 \qquad S = \sum s_i$$

Die Multiplizität M gibt die Einstellmöglichkeiten des Drehmomentvektors des Gesamtspins in einem Magnetfeld wieder.
Sind alle Elektronen gepaart, gehört zu jedem Elektron mit der Spinquantenzahl $s = +\frac{1}{2}$ ein anderes mit der Spinquantenzahl $s = -\frac{1}{2}$. Für den Gesamtspin $S = \sum s_i$ ergibt sich dann $S = 0$ und für die Multiplizität $M = 1$. Dieser Zustand wird Singulett-Zustand genannt. Haben zwei ungepaarte Elektronen parallelen Spin, so ergibt sich: $S = 1$ und damit die Multiplizität $M = 3$. Man nennt dies einen Triplettzustand.
Da die meisten organischen Moleküle eine gerade Anzahl spingepaarter Elektronen enthalten, ist ihr Grundzustand der Singulettzustand.

π-Elektronen werden in den meisten Fällen weniger fest gebunden als σ-Elektronen.
Sie lassen sich deshalb leichter anregen. Dennoch liegt der Anregungsbereich für Elektronen aus isolierten π-Bindungen im entfernten UV-Bereich (200-250nm). Der Anregungsbereich für π-Elektronen aus aromatischen Systemen liegt je nach System zwischen nahem UV und nahem IR (250-750nm) (64).
Durch Energieaufnahme kann ein Elektron das Orbital wechseln, wobei die Multiplizität erhalten bleibt ($S_0 \rightarrow S_1^*$). Durch die neue Elektronenkonfiguration sind die Atomkerne nun schwächer aneinander gebunden. Nach Einstellen des neuen Gleichgewichts ist nun unter Spinumkehr ein Übergang (Intersystem Crossing) zu einem energetisch niederer liegenden T_1^* Triplett-Zustand möglich. Ein Übergang $T_1^* \rightarrow S_0$ ist jetzt direkt möglich. Eine Rückkehr $T_1^* \rightarrow S_1^* \rightarrow S_0$ ist unwahrscheinlich da hierzu Energie aus der Umgebung aufgenommen werden muß. Möglich ist dies aber dennoch. Die verschiedenen Möglichkeiten der Übergänge zeigt das Jablonski-Diagramm in Abb. 10 (65).

JABLONSKI-DIAGRAMM

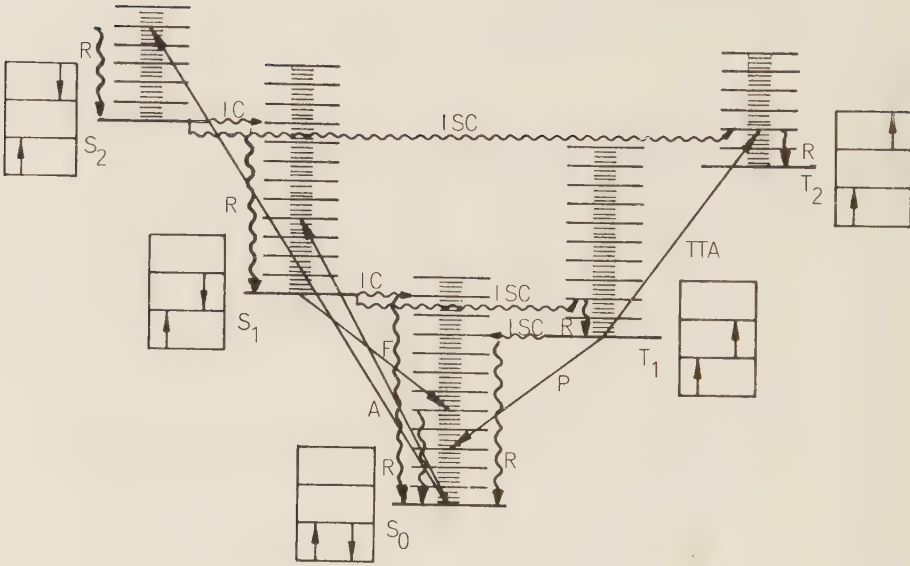


Abb.10 (65)

A	Absorption
F	Fluoreszenz
IC	Internal Conversion
ISC	Intersystem Crossing
P	Phosphoreszenz
R	Schwingungs- und Rotationsrelaxation
TTA	Triplett-Triplett-Absorption

Gewellte Linien geben strahlungslose Übergänge an

Die Unterschiede der Wechselwirkung eines Photons mit einem Elektron eines Atoms oder mit einem Elektron eines Molekülsystems sind in einem Absorptionsspektrum deutlich zu erkennen.

Der Übergang eines freien Elektrons oder eines Valenzelektrons eines Atoms vom Grundzustand in den angeregten Zustand ergibt eine einzige Absorptionslinie.

Wird der Versuch mit einem Molekül durchgeführt, werden sich mehrere Linien ergeben, die den Übergängen aus den einzelnen vibronischen Termen des Grundzustandes in die vibronische Terme des Anregungszustandes entsprechen. Die Übergänge zwischen den einzelnen "Rotationstermen" können normalerweise von Spektrometern nicht mehr aufgelöst werden. Sie führen daher zu einer Verbreiterung der Banden. Eine zusätzlich Verbreiterung der Band ergibt sich aus den Wechselwirkungen gelöster Moleküle mit dem Lösungsmittel.

Der Übergang eines Elektrons vom Grundzustand in den angeregten Zustand erfolgt sehr schnell. Es kann angenommen werden, daß sich während dieses Zeitraumes die Kernkoordinaten nicht ändern, d.h., daß der Übergang "vertikal" erfolgt (Franck-Condon-Prinzip).

Abb.11 zeigt die Potentialkurven zweiatomiger Moleküle. Ebenfalls eingetragen sind die Schwingungswellenfunktionen der einzelnen Terme. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Übergang möglich ist, ist umso größer, je größer die Überlappung der einzelnen Wellenfunktinen ist. Liegen die Potentialkurven, wie in Abb.11a gezeigt, in Grund- und Anregungszustand mit ihren Minima genau übereinander, ist der 0-0-Übergang gegenüber anderen Übergängen bevorzugt. In Abb.11b ist eine Situation dargestellt, in der der 0-2-Übergang begünstigt sein muß, da sich hier die Wellenfunktionen besser als beim 0-0-Übergang überlappen.

Unter den Abb.11a und 11b sind die sich ergebenden Spektren wiedergegeben, wobei die umhüllenden Kurven die durch Rotationsterme verbreiterten Banden wiedergeben sollen.

POTENTIALKURVEN ZWEIATOMIGER MOLEKÜLE

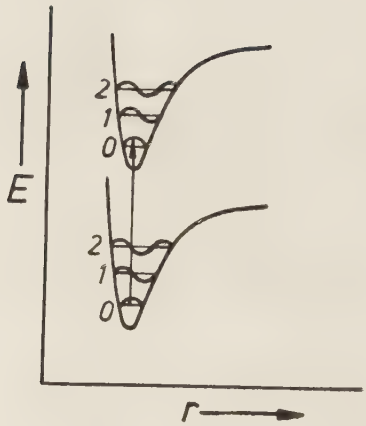


Abb. 11a

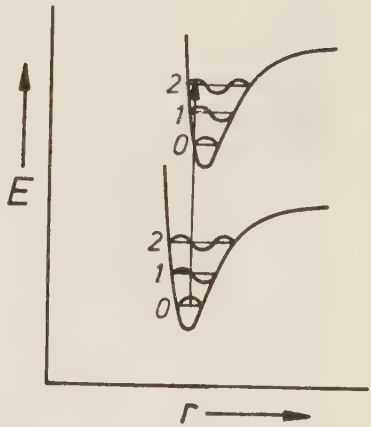
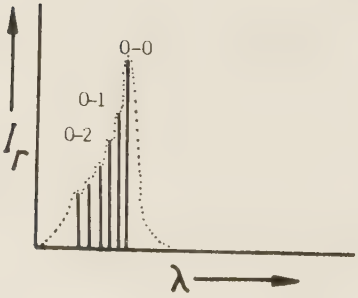
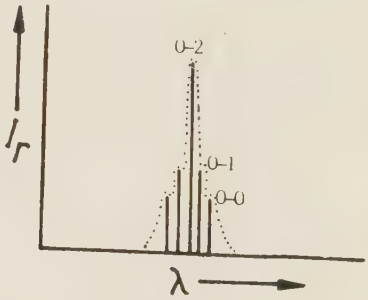


Abb. 11b





Potentialkurven zweiatomiger Moleküle mit den zugehörigen vibronischen Übergängen und den durch Rotationsterme verbreiterten Linien. (66)

3.2.2 Strahlungslose Vernichtung der Anregungsenergie

Durch Schwingungs- und Rotationsrelaxation (siehe Abb. 3) gelangt das angeregte Molekül rasch in einen Kernschwingungsterm nahe dem Minimum der dazugehörigen Potentialkurve. Kommt es nun zur zufälligen Überlappung dieser Schwingungswellenfunktion mit einem energetisch hohen vibronischen Term des Grundzustandes, kann das aktivierte Molekül wieder in ein, allerdings stark schwingendes, inaktiviertes Molekül übergehen.
Abb.12 zeigt die Potentialkurven für ein Molekül im Grundzustand (A) und im angeregten Zustand (A*), für das dieser Fall eintreten könnte.

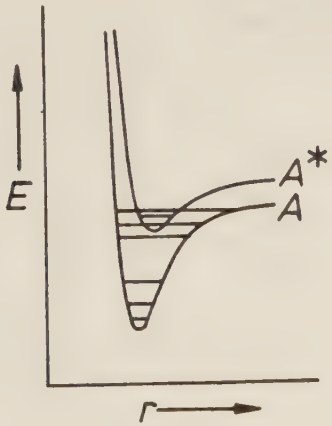


Abb. 12
Potentialkurvenchema für ein Molekül im Grund-(A) und Anregungszustand (A*)

Wegen der Höhe des anzuregenden Schwingungsterms im Grundzustand ist dieser Übergang allerdings sehr selten.

Wahrscheinlicher als die in Abb. 5 gezeigte Desaktivierung ist der Übergang zwischen zwei angeregten Zuständen, wie ihn die Abbildungen 13 und 14 verdeutlichen.
Der Kurvenverlauf in Abb.13 fordert für den Übergang aus dem angeregten Zustand A* in einen zweiten angeregten Zustand A** nur die Anregung einer niedrigen Kernoberschwingung. Noch schneller erfolgt der Übergang dann, wenn sich die Potentialkurven der angeregten Zustände schneiden. Ohne den Betrag der Kernschwingungsenergie wesentlich zu ändern, kann nach Abb.14 das Molekül aus dem angeregten Zustand A*, beim Kernabstand $r_ü$, in den zweiten angeregten Zustand A** übergehen. Ist der zweite angeregte Zustand metastabil, endet der Übergang letztlich in strahlungsloser Desaktivierung.

Diese Art von Übergängen ist verantwortlich für die Störungen in der Schwingungstermfolge der Spektren zweiatomiger Moleküle.

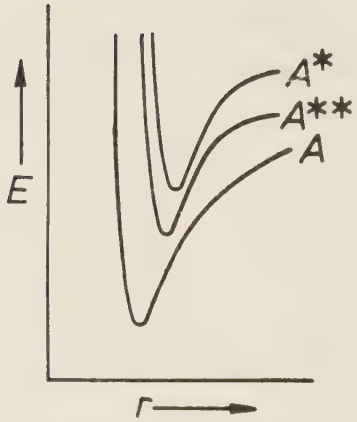


Abb.13
Potentialkurvenchema für ein Molekül mit einem zweiten Anregungszustand

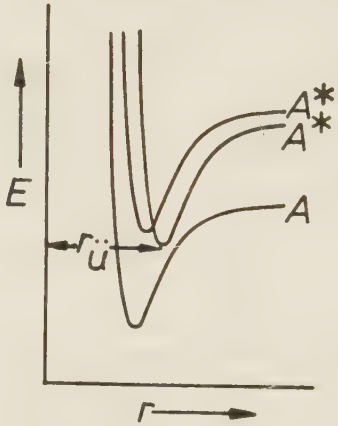


Abb.14
Potentialkurvenchema für ein Molekül mit zwei Anregungszuständen, deren Potentialkurven sich schneiden

In den bisher betrachteten Fällen wurde davon ausgegangen, daß das Minimum der Potentialkurve des Anregungszustandes unterhalb des Wertes für die Dissoziationsenergie des Grundzustandes liegt. Abb.15 zeigt das Potentialkurvenchema für ein Molekül, das zwar einen stabilen Anregungszustand hat, d.h. die Potentialkurve des angeregten Zustandes hat ein Minimum, aber dieses Minimum liegt energetisch über dem Wert für die Dissoziationsenergie des Grundzustandes. Das bedeutet, daß das Molekül aus dem angeregten Zustand in die Dissoziation übergeht. *Förster* (67) bezeichnet diesen Vorgang als Prädissoziation.

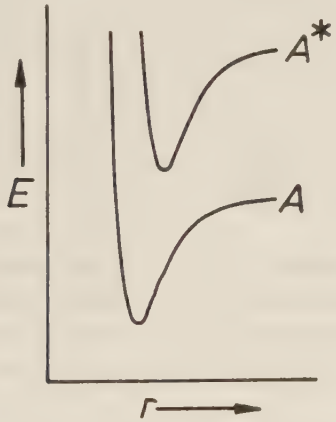


Abb. 15
Potentialkurvenchema für ein Molekül mit Anregungszustand über der Dissoziationsenergie

Deutlicher wird der Begriff Prädissoziation, wenn die Potentialkurve des ersten angeregten Zustandes A* die Kurve des zweiten Anregungszustandes A** berührt oder sogar schneidet. Der zweite angeregte Zustand sei instabil, d.h. seine Potentialkurve hat kein Minimum. Abb.16 zeigt den Fall, daß die Potentialkurve des ersten angeregten stabilen Zustandes die Potentialkurve des zweiten angeregte instabilen Zustandes fast berührt. Bei Abb.17

schneidet die Potentialkurve des ersten angeregten stabilen Zustandes die des zweiten angeregten instabilen Zustandes. Der Strahlungslose Übergang vom angeregten stabilen Zustand zur Dissoziation erfolgt in diesen beiden Fällen rasch.

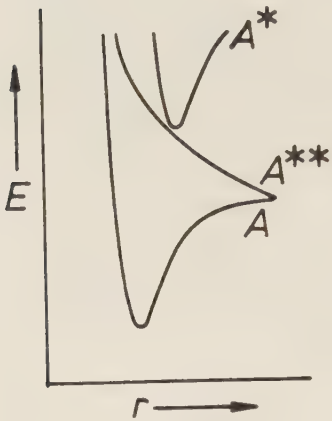


Abb. 16
Potentialkurvenchema für ein Molekül mit zweitem angeregten instabilen Zustand.

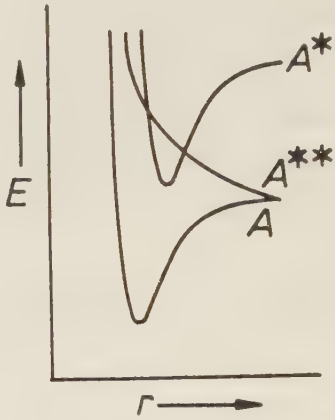


Abb. 17
Schnit der Potentialkurve des ersten angeregten stabilen mit der des zweiten angeregten instabilen Zustandes.

Eine weitere Möglichkeit schließlich ist die, daß das Molekül überhaupt keinen stabilen Anregungszustand besitzt. Das bedeutet, daß das Molekül nach Anregung in den instabilen angeregten Zustand übergeht, also dissoziiert.
(Abbildungen 12 - 17 nach (67))

3.2.3 Desaktivierung elektronisch angeregter Moleküle durch Lichtemission

3.2.3.1 Fluoreszenz

Ein durch Elektronen angeregtes Molekül kann also über Interkombination (Intersystem Crossing, ISC), über innere Umwandlung (Internal Conversion, IC) oder direkt über Schwingungs- und Rotationsrelaxation in den Grundzustand übergehen. (Siehe Abb.3)

Alternativ hierzu kann das Molekül aber auch eine kurze Zeit (10^{-8} sek) im niedrigsten angeregte Zustand verbleiben und dann, je nach energetischem Abstand zwischen Grund- und Anregungszustand, ultraviolettes oder sichtbares Licht emittieren. Das Molekül wird auf irgendeinen vibronischen Term des Grundzustandes gelangen. Durch thermische Relaxation erreicht dann das Molekül den niedrigsten vibronischen Term des Grundzustandes. Die Emission beim Übergang aus dem niedrigsten angeregten Singulettzustand in einen vibronischen Term des Singulettgrundzustandes wird Fluoreszenz genannt.

Da Relaxationsprozesse im angeregten Zustand nach der Lichtabsorption auftreten, werden sie in Absorptionsspektren nicht wiedergegeben. Ebenso werden Relaxationen im Grundzustand, da sie nach der Emission auftreten, auch nicht im Fluoreszenzspektrum wiedergegeben.

Da alle Absorptionsvorgänge vom gleichen vibronischen Niveau des Grundzustandes ausgehen und in den verschiedenen vibronischen Termen des angeregten Zustandes enden, geben Absorptionsspektren die Struktur der vibronischen Terme des Anregungszustandes (angeregter Franck-Condon-Zustand) wieder.

Da jede Fluoreszenz vom niedrigsten angeregten Singlettzustand ausgeht und in irgendeinem vibronischen Term des Grundzustandes endet (Franck-Condon-Grundzustand), gibt das Fluoreszenzspektrum die vibronische Struktur des Franck-Condon-Grundzustandes wieder (68).

Die Übergänge zwischen dem niedrigsten vibronischen Term im angeregten Zustand und dem niedrigsten vibronischen Term im Grundzustand sind für Absorption und Fluoreszenz energetisch

gleich. Dieser 0-0-Übergang entspricht der langwelligsten Bande beim Absorptionsspektrum und der kurzwelligsten Bande beim Fluoreszenzspektrum.

Haben der Franck-Condon-Grundzustand und der niedrigste angeregte Zustand gleiche vibronische Struktur (Überlappung), werden die langwelligen Absorptionsbande und die kurzwelligen Fluoreszenzbande ein spiegelbildähnliches Aussehen haben. Das Absorptionsspektrum liegt dann auf der kurzwelligen Seite und das Fluoreszenzspektrum auf der langwelligen Seite der 0-0-Bande.

Da jedoch die die Ladungsverteilung in Grund- und Anregungszustand voneinander verschieden ist, werden auch die vibronischen Terme dieser Zustände voneinander verschieden sein.
Dies hat zur Folge, daß sich kein ganz perfektes Spiegelbild der einzelnen Bande voneinander ergeben wird.
Abb. 18 verdeutlicht dieses spiegelbildliche Aussehen der Spektren. In Abb. 19 sind chematisch die einzelnen Übergänge für die jeweiligen Bande angegeben.

ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ABSORPTION UND FLUORESZENZ
(m und m' sind Schwingungsquantenzahlen der jeweiligen vibronischen Terme)

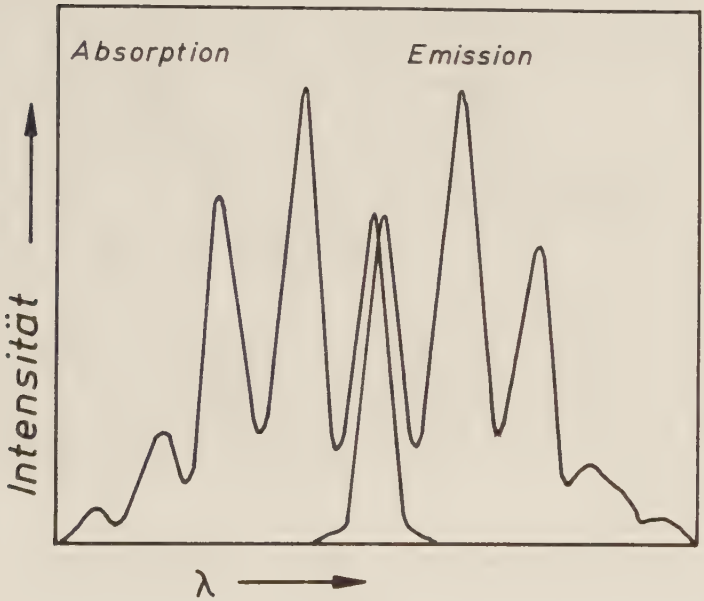


Abb. 18

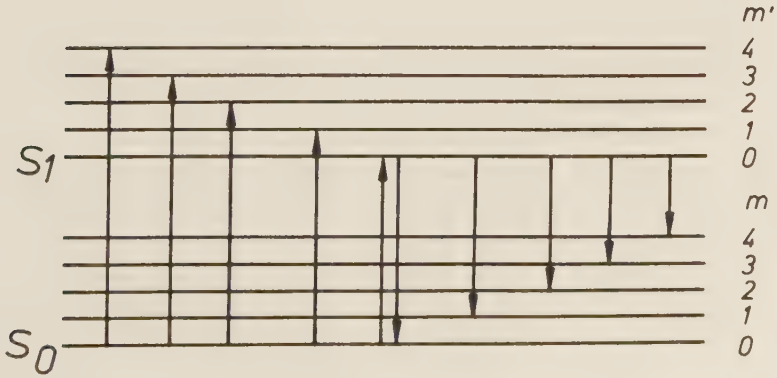


Abb. 19 (69)

3.2.3.1.1 Einflüsse auf die Lage der Fluoreszenzbande

Da Fluoreszenz vom niedrigsten angeregten Zustand ausgeht und im Grundzustand endet, sind die Einflüsse, die die Lage der Bande beeinflussen, qualitativ mit denen gleichzusetzen, die die Lage der Absorptionsbande beeinflussen.
So führt die Vergrößerung eines aromatischen Systems zu einer langwelligeren Verschiebung der Fluoreszenz (nach dem "Kastenmodell" ist die Wellenlänge im Absorptionsmaximum eines Übergangs dem Quadrat der Länge eines π-Elektronensystems proportional).

Die Stabilisierung des angeregten Zustandes durch exocyclische Konjugation durch Substituenten wie -OH, $-NH_2$ und -CO- führt zu einer Absorption und somit zu einer Fluoreszenz bei größeren Wellenlängen gegenüber den unsubstituierten Molekülen. Substituenten, die nicht spürbar mit dem aromatischen Ring konjugieren, wie etwa $-NH_3^+$ oder $-SO_3^-$, beeinflussen den angeregten Zustand in weit geringerem Maße als stark konjugierende Substituenten und führen somit zu einer weit geringeren Verschiebung.

Auch die Wahl des Lösungsmittels kann die Lage der Fluoresbande beeinflussen.

Einerseits gilt zwar das Franck-Condon-Prinzip auch für Emissionsvorgänge, andererseits ist aber die Lebensdauer eines angeregten Moleküls deutlich größer als die für eine Änderung der Kernkonfiguration benötigte Zeit (10^{-8}sek gegenüber 10^{-12}sek). Ein Molekül besitzt im angeregten Zustand aber ein größeres Dipolmoment μ_1 als im Grundzustand (μ_0). Befindet sich das Molekül in einem polaren Lösungsmittel, ist die elktrostatische Wechselwirkung des Moleküls im angeregten Zustand mit dem Lösungsmittel stärker als im Grundzustand.

Wenn sich die Moleküle in einem polaren Lösungsmittel befinden, finden tatsächlich Änderungen in der Kernkonfiguration während der Lebensdauer des angeregten Moleküls statt. Diese Wechselwirkungen führen zu einer Verringerung der Energie des emittierten Lichts. Das angeregte Molekül relaxiert aus einem angeregten "Franck-Condon-Zustand" S_1 in den Gleichgewichtszustand S_1'.

Nun erfolgt ein vertikaler Übergang in den Grundzustand S_0. Da das Molekül jetzt energiereicher ist als im Gleichgewichtszustand, erfolgt erneut Relaxation nach S_0'. Abb. 20 zeigt den schematischen Verlauf dieser Vorgänge.

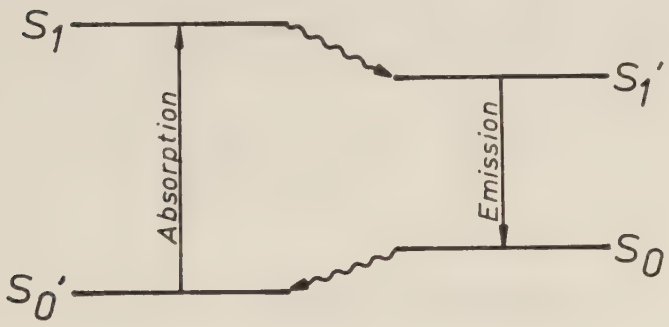


Abb. 20

Absorption und Fluoreszenz in einem polaren Lösungsmittel. S_1 und S_0 Franck-Condon-Zustände. S_1' und S_0' Gleichgewichtszustände. Pfeile: Strahlungsübergänge, Wellenlinien: Strahlungslose Übergänge.

3.2.3.1.2 Parameter zur Beschreibung der Fluoreszenz

Quantenausbeute

Nicht alle Moleküle kehren über Lichtemission aus dem niedrigsten angeregten Zustand in einen Grundzustand zurück.

Intersystem Crossing und *Internal Conversion* konkurrieren mit der Fluoreszenz.
Der Begriff, der beschreibt, in welchem Verhältnis absorbierte zu emittierten Photonen stehen, wird Quantenausbeute (Φ_f) genannt.

$$\Phi_f = \frac{\text{Anzahl emittierter Photonen}}{\text{Anzahl absorbierter Photonen}}$$

Unter konstanten Bedingungen ist die Quantenausbeute eine physikalische Konstante.
Ausgedrückt mit den Geschwindigkeitskonstanten für die miteinander konkurrierenden Desaktivierungsprozesse aus dem niedrigsten angeregten Zustand ergibt sich:

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_f + \sum k_d}$$

Hierbei gibt k_f die Wahrscheinlichkeit für eine Fluoreszenz des Moleküls an (Geschwindigkeitskonstante für die Fluoreszenz) und $\sum k_d$ ist die Summe aller Geschwindigkeitskonstanten für alle mit der Fluoreszenz konkurrierenden Desaktivierungszustände aus dem ersten angeregten Zustand (für isolierte Moleküle ist $\sum k_d$ die Summe der Geschwindigkeitskonstanten für *Internal Conversion* und *Intersystem Crossing*).

Gewöhnlich nimmt der Wert für Φ_f mit steigender Temperatur ab. Bei höheren Temperaturen werden häufiger höhere vibronische Terme des niedrigsten angeregten Zustandes besiedelt. Dies begünstigt die Desaktivierung über strahlungslose Relaxationsprozesse. Hierdurch wird $\sum k_d$ größer und damit Φ_f kleiner.

Die Lebensdauer des niedrigsten angeregten Zustandes für den Fall, daß er mehr durch Strahlung desaktiviert wird, ist der Kehrwert von k_f und wird mit $\tau_f{}^\circ$ bezeichnet.

Der Kehrwert von $k_f + \sum k_d$ entspricht der realen Lebensdauer des niedrigsten angeregten Zustandes. Er entspricht dem Zeitmittel, in dem das Molekül im angeregten Zustand verweilt. Seine Bezeichnung ist τ_f. Die Quantenausbeute läßt sich nun wie folgt ausdrücken:

$$\Phi_f = \frac{\tau_f}{\tau_f{}^\circ}$$

3.2.3.1.3 Quantitative Grundlagen

Der Bezug zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration der Probe kann über das *Lambert-Beer'sche* Gesetz hergeleitet werden. Wenn

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon cd}$$

ε : Molarer Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge
c : Konzentration $(mol \cdot \ell^{-1})$
d : Optische Weglänge

der Teil der Lichtintensität ist, der bei der Anregung übertragen wird, gilt für den Teil des Lichtes, der absorbiert wird:

$$\frac{I_a}{I_o} = 1 - \frac{I}{I_o} = \frac{I_o - I}{I_o} = 1 - 10^{-\varepsilon cd}$$

Mit der Quantenausbeute Φ_f der Fluoreszenz ergibt sich für den Teil des absorbierten Lichtes, der als Fluoreszenz erscheint:

$$\frac{I_f}{I_o} = \Phi_f \frac{I_a}{I_o} = \Phi_f(1-10^{-\varepsilon cd})$$

Die Intensität des emittierten Lichtes ergibt sich zu:

$$I_f = \Phi_f I_o \ (1 - 10^{-\varepsilon cd})$$

Der Term $1 - 10^{-\varepsilon cd}$ kann mit einer Potenzreihe ausgedrückt werden.

$$1 - 10^{-\varepsilon cd} = 2{,}3\ cd + \frac{(2{,}3\varepsilon cd)^2}{2!} - \frac{(2{,}3\varepsilon cd)^3}{3!} + \frac{(2{,}3\varepsilon cd)^4}{4!} -$$

Für sehr kleine Werte von εc können die höheren Glieder der Reihe vernachlässigt werden. Es ergibt sich:

$$1 - 10^{-\varepsilon cd} = 2{,}3\varepsilon cd$$

und damit:

$$I_f = 2{,}3\Phi_f I_o \varepsilon cd$$

Dies ist die fundamentale Bedingung für die quantitative Fluorimetrie. Bei genügend großer Verdünnung besteht ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Fluoreszenzintensität der Lösung. Ist I_{fu} die Fluoreszenzintensität einer unbekannten Konzentration und I_{fs} die Intensität einer Standardlösung, ergibt sich für die unbekannte Konzentration c_u und die Standardkonzentration c_s folgender Zusammenhang:

$$\frac{I_{fu}}{I_{fs}} = \frac{c_u}{c_s}$$

3.2.3.1.4 Meßbedingungen für die quantitative Fluoreszenzanalytik

Es ist unerläßlich, daß die Fluoreszenzintensität I_f unter Bedingungen mit möglichst kleiner Standardabweichung gemessen wird. Wichtige Punkte, die die Qualität der Messung wesentlich beeinflussen können sind, unter anderen:

1. Stabilität der Erregerintensität I_o
2. Detektorstabilität (Driften, Signal-Rauschverhältnis)
3. Möglichst fluoreszenzfreie Meßgefäße, verwendete Optiken in geeigneter Qualität (auch Linsenkitt fluoresziert)
4. Konstante Lösungsmitteleigenschaften
5. Konstante Temperatur (Die Temperatur beeinflußt nicht nur, wie schon aufgeführt, die Quantenausbeute, die Temperatur bestimmt auch die Konzentration des unerwünschten Sauerstoffs)

3.2.3.2 Phosphoreszenz

Der mit Emission verbundene Übergang vom niedrigsten Triplettzustand in den Singlettgrundzustand wird Phosphoreszenz genannt. Wegen des Verbots der Spinumkehr hat dieser Vorgang eine höhere Abklingzeit als die Fluoreszenz. Wie die Fluoreszenz wird die Phosphoreszenz häufig bei aromatischen Molekülen und ihren Derivaten beobachtet. Wegen der langen Lebensdauer des Triplettzustandes (10^{-5} bis einige Sekunden) können andere Vorgänge wie Internal Conversion, Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel und photochemische Reaktionen erfolgreich mit der Phosphoreszenz konkurrieren. Daher wird Phosphoreszenz überwiegend bei niederen Temperaturen (77K), in hochviskosen Lösungen oder in sehr verdünnten Gasen gemessen. Unter diesen Bedingungen wird die vollständige Desaktivierung des Triplettzustandes durch Kollisionsvorgänge weniger häufig.

Da die Übergänge bei der Phosphoreszenz gewöhnlich vom niedrigsten Triplettzustand ausgehen und bei irgendeinem vibronischen Term des Singlettgrundzustandes enden, gibt das Phosphoreszenzspektrum die vibronischen Terme des Grundzustandes wieder. Die charakteristischen Linien lassen sich normalerweise, gemäß den normalen Schwingungen des Moleküls im Grundzustand, mit dem entsprechenden IR-Spektrum vergleichen.
Anders als beim 0-0-Übergang der Fluoreszenz, wo Absorptions- und Emissionsbande unmittelbar nebeneinander liegen, ist die 0-0-Bande der Phosphoreszenz gegenüber der 0-0-Absorptionsbande deutlich zu größeren Wellenlängen verschoben.
Die Erweiterung des aromatischen Systems hat bei der Phosphoreszenz ähnliche Auswirkungen wie bei der Fluoreszenz. Es erfolgt eine Verschiebung in langwelligere Bereiche. Exozyklische Substituenten führen bei der Phosphoreszenz zu einer geringeren Verschiebung der Bande als bei der Fluoreszenz.

Die Quantenausbeute der Phosphoreszenz wird wie folgt definiert:

$$\Phi p = \Phi st \frac{k_p}{k_p + \sum k_j}$$

Hierbei ist k_p die Geschwindigkeitskonstante für die Phosphoreszenz. $\sum k_j$ ist die Summe aller Geschwindigkeitskonstanten für einmolekulare strahlungslose Desaktivierungsprozesse aus dem niedrigsten Triplettzustand. Φ_{st} gibt den Wirkungsgrad für Singlett-Triplett-Intersystem Crossing an.
Φ_p gibt das Verhältnis an zwischen der Gesamtzahl der Moleküle, die in den niedrigsten Singlettzustand angeregt wurden, und der Anzahl der schließlich phosphoreszierenden Moleküle. Die Quantenausbeute betrachtet hier im Gegensatz zur Fluoreszenz einen dreistufigen Vorgang.

Die für Φ_p gegebene Definition gilt unter der Voraussetzung, daß die Anzahl der Anregungen aus dem Grundzustand in den Triplettzustand vernachlässigbar gering ist gegenüber dem Intersystem-Crossing aus dem niedrigesten angeregten Singlettzustand.

3.2.3.3 Verzögerte Fluoreszenz

Vorwiegend in Medien mit hoher Viskosität wird eine weitere Emission mit langer Lebensdauer beobachtet. Diese Emission liegt bei kürzeren Wellenlängen als die Phosphoreszenz und kann, falls die Substanz unter Meßbedingungen fluoresziert, mit der Fluoreszenzbande zusammenfallen. Die Ursache für diese Emission ist die thermische Anregung eines Moleküls im niedrigsten Triplettzustand mit anschließendem Intersystem Crossing in den niedrigsten angeregten Singlettzustand mit darauffolgender Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz wird "verzögerte Fluoreszenz" genannt.

In festen Medien wird dieser Vorgang angeregt durch Erwärmung der Probe oder durch statistische Schwankungen der thermischen Energie des Triplettzustandes. Da dies Art Fluoreszenz zuerst bei Eosin beobachtet wurde nennt man sie "E-Typ verzögerte Fluoreszenz".

In viskosen Medien, in denen die Moleküle noch beweglich sind, führt der Zusammenstoß zweier Moleküle im Triplettzustand zu der thermischen Anregung des einen und zum Übergang in den Grundzustand des anderen (Triplett-Triplett-Annihilation). Dieser Vorgang wurde zuerst bei Pyren beobachtet und wurde daher "P-Typ verzögerte Fluoreszenz" genannt.

E-Typ verzögerte Fluoreszenz wird durch ein einzelnes Photon angeregt. Das bedeutet,die Fluoreszenzintensität ist direkt abhängig von der Intensität des anregenden Lichtes.

P-Typ verzögerte Fluoreszenz erfordert zwei Moleküle pro Vorgang. Dies bedingt eine relativ hohe Konzentration an absorbierenden Molekülen. Um einen Vorgang auszulösen,sind zwei Photonen nötig. Daher ist die Fluoreszenzintensität nun abhängig vom Quadrat der Intensität des anregenden Lichtes.

3.2.4 Lumineszenzlöschung

Durch Wechselwirkung der Moleküle im Grund- oder Anregungszustand mit anderen Teilchen in der Lösung kann die Fluoreszenz- oder Phosphoreszenzintensität verringert werden. Dies kann so weit führen, daß keine Emission mehr zu beobachten ist.

Substanzen, die derartige Löschvorgänge hervorrufen werden "Quencher" genannt. Der Löschvorgang selbst wird als "Quenching" bezeichnet.
Zwei Quenchvorgänge, das "dynamische" und das "statische" Quenching, lassen sich unterscheiden.

Beim dynamischen Quenching findet die Wechselwirkung zwischen Quencher und dem potentiell emittierenden Molekül während der Lebensdauer des angeregten Zustandes statt. Das Ausmaß des dynamischen Quenching wird damit durch die Lebensdauer des angeregten Zustandes und der Konzentration des Quenchers bestimmt. Durch Wechselwirkungen des Quenchers mit dem angeregten Molekül können nach Elektronentransfer oxidierte oder reduzierte Teilchen entstehen, die nicht mehr fluoreszenzfähig sind. Der Austausch von Schwingungsenergie des gebildeten "Quencher-Molekülkomplexes" mit Lösungsmittelmolekülen kann sich ergeben. Schließlich werden durch Internal Conversion ein Teil oder alle Moleküle zum Grundzustand zurückgeführt, was zur Verringerung der Quantenausbeute führt.

Beim statischen Quenching finden die Wechselwirkungen zwischen dem Quencher und dem Molekül im Grundzustand statt. Der so gebildete Komplex kann gewöhnlich nicht lumineszieren. Auch wenn dieser Komplex im angeregten Zustand dissoziiert, wird doch die Relaxation zum Grundzustand gegenüber der Photodissoziation überwiegen. Auch die Komplexbindung im Grundzustand führt zu einer Verringerung der Quantenausbeute.

Beim dynamischen Quenching ist die Quantenausbeute Abhängig von der Kinetik der Photoreaktion.

Beim statischen Quenching hängt die Quantenausbeute ab von der Komplexstabilität des im Grundzustand gebildeten Komplexes.

Die Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzquantenausbeute (Φ/Φ_o) von der Konzentration des Quenchers $[Q]$ kann wie folgt angegeben werden:

$$\Phi/\Phi_o = \frac{1 - \gamma\alpha}{1 + \gamma k_D \tau^\circ [Q]}$$

τ°: Mittlere Lebensdauer des angeregten Zustandes in Abwesenheit des Quenchers $Q = 0$

k_D: Geschwindigkeitskonstante für die Komplexbildung im angeregten Zustand

γ : Gibt die Wahrscheinlichkeit für die Desaktivierng des Komplexes gegenüber der Dissoziation an.

α : Gibt den Bruchteil des Komplexes an, der im Grundzustand gebildet und durch direkte Absorption angeregt wird.

Wenn die Komplexbildung im Grundzustand vernachlässigbar klein wird, oder wenn bei einer Wellenlänge angeregt wird, bei der der Komplex nicht absorbiert ($\alpha \rightarrow 0$), ergibt sich mit $k_Q = \gamma k_D \tau^\circ$ die "Stern-Volmer"-Gleichung:

$$\Phi/\Phi_o = \frac{1}{1 + k_Q [Q]}$$

Die "Stern-Volmer"-Gleichung verknüpft die Fluoreszenzquantenausbeute mit der Konzentration des Quenchers und dem Anteil des dynamischen Quenching.

Wenn sich bei Gegenwart des Quenchers die Verteilungsfunktion des Absorptions- und des Fluoreszenzspektrums nicht ändert,

darf für das Verhältnis der Quantenausbeuten (Φ/Φ_o) der Quotient der Fluoreszenzintensitäten (F/F_o) eingesetzt werden.

Da k_D eine sehr charakteristische Größe für die Art des Quenchers ist, kann somit die hohe Empfindlichkeit, die die Fluoreszenzspektroskopie bietet, auch auf nichtfluoreszierende Substanzen angewendet werden. Man macht sich die speziellen Löschfähigkeiten des Quenchers auf eine stark fluoreszierende Substanz zu Nutze.

3.2.4.1 Häufig störende Quencher

3.2.4.1.1 Sauerstoff

Ein Quencher, der allgegenwärtig und kaum auszuschließen ist, ist molekularer Sauerstoff. In polaren Lösungsmitteln kann Sauerstoff zu einem ernsten analytischen Problem werden. Auf welche Art und Weise Sauerstoff als Quencher wirkt hängt sehr stark von der Zusammensetzung der Lösung ab.
Folgende Mechanismen für das Quenchen des angeregte Singlettzustandes durch molekularen Sauerstoff sind denkbar (64).

1.) Oxidation des angeregten Zustandes:

$$^{S}A^{*} + {}^{T}O_2 \rightarrow A^{+} + O_2^{-}$$

2.) Energietransfer von $^{S}A^{*}$ auf $^{T}O_2$

$$^{S}A^{*} + {}^{T}O_2 \rightarrow {}^{T}A^{*} + {}^{S}O_2^{*}$$

$$^{S}A^{*} + {}^{T}O_2 \rightarrow {}^{S}A + {}^{S}O_2^{*}$$

3.) Intersystem Crossing von $^{S}A^{*}$

$$^{S}A^{*} + {}^{T}O_2 \rightarrow {}^{T}A^{*} + {}^{T}O_2$$

4.) Internal Conversion von $^{S}A^{*}$

$$^{S}A^{*} + {}^{T}O_2 \rightarrow {}^{S}A + {}^{T}O_2$$

5.) Komplexbildung zwischen O_2 und ^{S}A.

(S ≙ Singulettzustand
T ≙ Triplettzustand, * ≙ Angeregter Zustand)

Für jeden dieser Mechanismen mag eine gewisse Wahrscheinlichkeit bestehen, wenn nur die Lösung speziell genug zusammengesetzt ist. Allgemeine Gültigkeit hat wohl nur der Mechanismus 3 (intersystem Crossing).

3.2.4.1.2 Quenching durch Metallionen

Die Koordination eines fluoreszierenden oder phosphoreszierenden aromatischen Liganden mit einem Metallion kann als Säure-Basereaktion betrachtet werden. Das Metallion als Elektronenpaarakzeptor fungiert als Lewissäure, der aromatische Ligand ist Elektronenpaardonor und somit die Lewisbase.

Analog kann auch die Protonierung des Liganden gesehen werden. Hier fungiert das Proton als Lewissäure.

In der Regel führt die Komplexbildung zu einer langwelligen Verschiebung der Absorption und Fluoreszenz des Komplexes gegenüber dem freien Liganden.
Der Effekt der Rotverschiebung ist bei Komplexen mit Übergangsmetallen wesentlich stärker als bei Komplexen mit Nicht-Übergangsmetallen. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Übergangsmetallionen ein Elektron aus einem d-Orbital in ein nicht besetztes π-Orbital des Liganden überführen. Durch diese Charge-Transfer-Wechselwirkung wird der angeregte Zustand des Komplexes gegenüber dem Grundzustand stärker stabilisiert.
Die Verschiebungen, die mit Nicht-Übergangsmetallionen erreicht werden, gleichen den Effekten, die durch Protonierung der Liganden erzielt werden. Dennoch kann nicht in allen Fällen eine gute Übereinstimmung gefunden werden.
Viele Komplexe der Übergangsmetalle mit Aromaten fluoreszieren und phosphoreszieren nicht, obwohl es die Liganden tun. So betrachtet kann die Komplexbildung mit Übergangsmetallionen als "statisches Quenching" bezeichnet werden.

Diese Vorgänge haben große praktische Bedeutung. Es ist sehr schwer alle Metallionen aus den Lösungen fernzuhalten. Besondere Aufmerksamkeit muß man auch hier der Reinigung des Wassers zukommen lassen. Von der Säuberung der Geräte mit Chrom-Schwefelsäure sollte man überhaupt ablassen.

3.2.4.1.3 Konzentrationseffekte

Die bisher aufgeführten Betrachtungen galten für Lösungen mit niederen Konzentrationen ($\leq 10^{-4}$ mol$\cdot\ell^{-1}$). Höhere Konzentrationen können die Interpretation der Elektronenspektren sehr erschweren.

Bei höheren Konzentrationen hört die Linearität zwischen Absorption und Konzentration der absorbierenden Teilchen auf. Dies bedeutet, daß die Absorption in geringerem Maße zunimmt, als die Konzentration. Bei sehr hohen Konzentrationen kann das gesamte Anregungslicht absorbiert werden, die Absorption wird unendlich. Schon weit unterhalb dieser Konzentration ist lineares Verhalten zwischen Absorption und Konzentration nicht mehr gegeben.

Mit steigender Konzentration nehmen die Stöße zwischen den gelösten Moleküle zu. Viele dieser Moleküle sind in der Lage polymere Aggregate zu bilden. Die Zunahme der Konzentration an "Polymeren" ist verknüpft mit der Abnahme der Konzentration der Monomere, deren Absorption beobachtet wird.

Lagern sich aromatische Moleküle zusammen, kann diese Aggregation zu einer Rotverschiebung der Absorption führen. Aber auch wenn die Zusammenlagerung nicht stark genug ist, um zu einer Rotverschiebung zu führen, nimmt auch hier die Konzentration der Monomere ab. Die Absorption verhält sich nicht mehr linear.

Mit steigender Konzentration zeigen auch die Fluoreszenz- und die Phosphoreszenzintensitäten Abweichungen von der Linearität. Diese Abweichungen beginnen jedoch schon bei weit geringeren Konzentrationen, als sie bei den Abweichungen für die Absorption beobachtet werden. Häufig wird sogar beobachtet, daß bei Konzentrationen, bei denen die Absorption nicht mehr linear zunimmt, die Fluoreszenzintensität beginnt abzunehmen. Abb. 21 zeigt den möglichen Kurvenverlauf für einen derartigen Vorgang.

Abhängigkeit der Absorption und der Fluoreszenz von der Konzentration

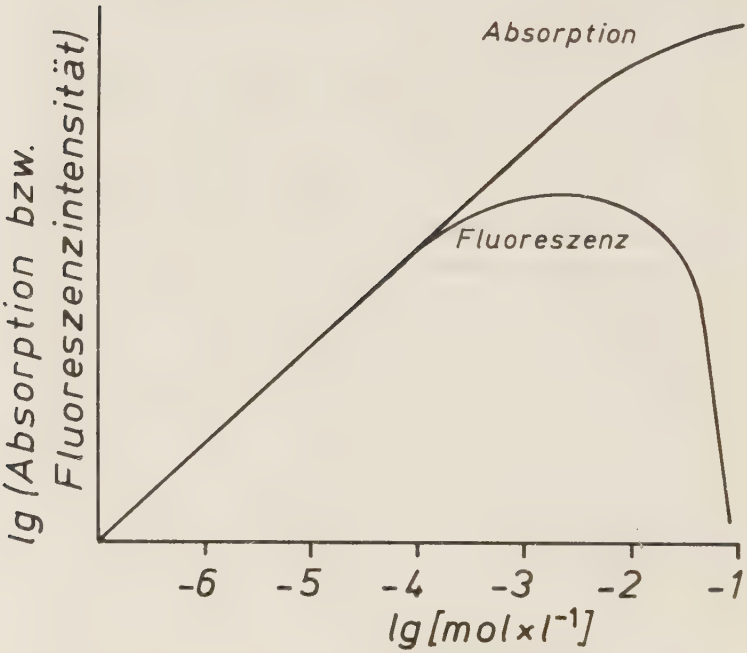


Abb.21 (68)

Für das nichtlineare Verhalten der Fluoreszenzintensität bei niedrigen Konzentrationen ($\geqq 10^{-4}$ mol$\cdot\ell^{-1}$) sind Wechselwirkungen zwischen den gelösten Molekülen nicht verantwortlich. Dies ist vielmehr die Folge davon, daß die Fluoreszenzintensität (und auch die Phosphoreszenzintensität) nicht linear von der Konzentration der absorbierenden Teilchen abhängt. Nur bei sehr niedrigen Konzentrationen werden die höheren Terme der Gleichung

$$1 - 10^{-\varepsilon cd} = 2{,}3\ cd + \frac{(2{,}3\varepsilon cd)^2}{2!} - \frac{(2{,}3\varepsilon cd)^3}{3!} + \frac{(2{,}3\varepsilon cd)^4}{4!} -$$

vernachlässigbar klein.
Bei etwas höheren Konzentrationen können sich Effekte aus den Wechselwirkungen zwischen den Molekülen zu dieser Nichtlinearität hinzuaddieren. Die fragliche Konzentration liegt aber immer noch zu niedrig, um auf Aggregation aus dem Absorptionsspektrum schließen zu können. Es muß sich folglich hier noch um Wechselwirkungen im niedrigsten angeregten Zustand handeln.
Zwei Arten der Wechselwirkungen mit den Molekülen im angeregten Zustand sind möglich. Bilden Moleküle im angeregten Zustand Polymere mit Molekülen der gleichen Art im Grundzustand, nennt man dieses Polymer "Excimer". Bei Aromaten führt Excimerenbildung zur Rotverschiebung.

Bilden sich Polymere aus Molekülen im angeregten Zustand und aus Molekülen im Grundzustand, die jedoch von unterschiedlicher Art sind, wird das Polymer "Exciplex" genannt.

Ein weiterer Konzentrationseffekt ist der Energietransfer. Beim Energietransfer wird während der Lebensdauer des angeregten Zustandes die Anregungsenergie des angeregten Moleküls auf ein anderes Molekül, das sich in unmittelbarer Nähe befindet, übertragen. Diese Übertragung führt dazu, daß das ursprünglich angregte Molekül nicht mehr lumineszieren. Das durch den Energietransfer angeregte Molekül ist nun eventuel lumineszenzfähig.

Zwei konzentrationsabhängige Mechanismen des Energietranfers sind möglich.

Beim Resonanz- Anregungs- Transfermechanismus, auch Dipol-

oder Förstermechanismus genannt,befinden sich Donor- und Akzeptormolekül gewöhnlich nicht in Kontakt miteinander. Abstände bis zu $7 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$ cm sind möglich. Man kann sich das angeregte, energieübertragende Molekül als elektrischen Dipol vorstellen, der in seiner unmittelbaren Nachbarschaft ein elektrisches Feld erzeugt. Andere Moleküle, die sich in derNähe befinden, können Energie aus diesem Feld aufnehmen. Sie gelangen in den angeregten Zustand. Da die Anregungsenergie von dem angeregten Donormolekül stammt, wird dieses strahlungslos in den Grundzustand zurückgeführt. Das nunmehr angeregte Molekül kann lumineszieren oder auch über einen der strahlungslosen Desaktivierungsprozesse in den Grundzustand zurückkehren. Der Resonanz-Energie- Transfer ist in der sechsten Potenz abhängig vom Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül. Für die zugehörige Geschwindigkeitskonstante regibt sich:(68)

$$k_{RET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_o}{R} \right)^6$$

k_{RET} : Geschwindigkeitskonstante für den Resonanz-Energie-Transfer

τ_D : Lebensdauer des angeregten Donormoleküls

R : Mittlerer Abstand zwischen den Zentren der Donor- und Akzeptordipole

R_o : Der Abstand, bei dem Energietransfer oder Lumineszenz des Donordipols gleich wahrscheinlich sind. (Für ein gegebenes Donor- Akzeptorpaar ist R_o eine Konstante)

Ist $R_o > R$, ist Energietransfer wahrscheinlicher als Lumineszenz, ist $R_o < R$, ist Lumineszenz wahrscheinlicher als Energietransfer. Mit steigender Konzentration wird R kleiner und ein Resonanz-Energie- Transfer wird wahrscheinlicher.

Die Erscheinung des Resonanz- Energie- Transfers erfordert die Überlappung des Fluoreszenzspektrums des Donors mit dem Absorp-

tionsspektrum des Akzeptors. Jede Überlappung kann ausreichen, um das Akzeptormolekül in einen angeregten Franck-Condon Zustand zu überführen. Je größer jedoch die Überlappung, desto wahrscheinlicher wird der Energietransfer stattfinden.

Seltener als der Resonanz-Energie- Transfer wird der "Austauschmechanismus" des Anregungsenergietransfers beobachtet. Bei diesem Mechanismus müssen sich die Elektronenwolken des Akzeptor- und des Donormoleküls überlappen. Nun können die Elektronen mit der höchsten Energie des Donors und des Akzeptors gegeneinander ausgetauscht wereden. Dieser Austauschmechanismus wird besonders dann wirksam, wenn der sich im Gleichgewicht befindende angeregte Zustand des Donormoleküls etwas über dem angeregten Franck-Condon- Zustand des Akzeptormoleküls liegt.

Triplett-Triplett, Singulett-Triplett, Singulett-Singulett, und Triplett-Singulett- Energietransfer sind bei diesem Austausch mechanismus erlaubt. Der Transfer ist diffusionskontrolliert (Anzahl der Stöße) und somit abhängig von der Viskosität des Mediums.

Bei sehr hohen Konzentrationen der absorbierenden Substanz, können die Effekte, die auf einer Aggregation im Grundzustand beruhen, dafür sorgen, daß bei steigender Konzentration die Lumineszenz abnimmt.

Bei noch höheren Konzentrationen wird das Anregungslicht bereits vollständig absorbiert, bevor es ganz durch die Probe hindurchgetreten ist. Lumineszenz kann somit nur von einem Teil der Probe beobachtet werden.

Überlappen sich Absorptions- und Fluoreszenzspektrum der Probe, kann durch Reabsorption die Fluoreszenzintensität vermindert werden. Diese konzentrationsabhängige "Reabsorption" ist nur bei der Fluoreszenz beobachtbar, da sich Phosphoreszenzspektren nicht überlappen.

3.2.5 Effekte mit polarisiertem Licht

Eine Lichtwelle ist stets begleitet von einem elektrischen Feld, dessen Vektor in einer Ebene senkrecht zur Ausbreitungsrichtung schwingt, und einem magnetischen Feld, dessen Vektor in einer Ebene schwingt, die sowohl senkrecht zu der Bewegungsrichtung, als auch senkrecht zur Ebene des elektrischen Vektors liegt. Die Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Feldvektor des anregenden Lichts mit den π-Elektronen des absorbierenden Moleküls ist überwiegend für die Änderung des elektrischen Dipolmoments des Moleküls verantwortlich.

Da der absorptive Übergang auf der Wechselwirkung zweier durch Vektoren darstellbarer gerichteter Größen beruht, ist die Ausrichtung des elektrischen Vektors des anregenden Lichts gegen den Übergangsmomentvektor (die Linie, entlang der Ladung während des Übergangs transportiert wird), entscheidend für die Stärke der Wechselwirkung. Das Quadrat der skalaren Projektion des Übergangsmomentvektors auf den elektrischen Feldvektor ist der Intensität des beim Übergang absorbierten Lichtes proportional.

$$I_{abs} \propto (\cos\theta)^2$$

θ ist der Winkel zwischen dem Übergangsmomentvektor $\vec{M}$ des Moleküls und dem elektrischen Vektor des Lichts.

Bei unpolarisiertem Licht sind die elektrischen Vektoren auf alle Ebenen senkrecht zur Fortbewegungsrichtung des Lichtes verteilt. Ein direkter Zusammenhang zwischen den Richtungen von elektrischem Vektor und Übergangsmomentvektor kann somit nicht gefunden werden.

Die Emission eines Moleküls erfolgt in Richtung des Lumineszenzübergangmoments. Die Intensität, I_f, ist dem Quadrat des Übergangmoments proportional.

$$I_f \propto M^2$$

Hierbei ist M die Größe eines Vektors, der in die Komponenten $\vec{M}_{\parallel}$ und $\vec{M}_{\perp}$ aufgeteilt werden kann (Siehe Abb.).

GEOMETRISCHER AUFBAU EINER POLARISATIONSMESSUNG

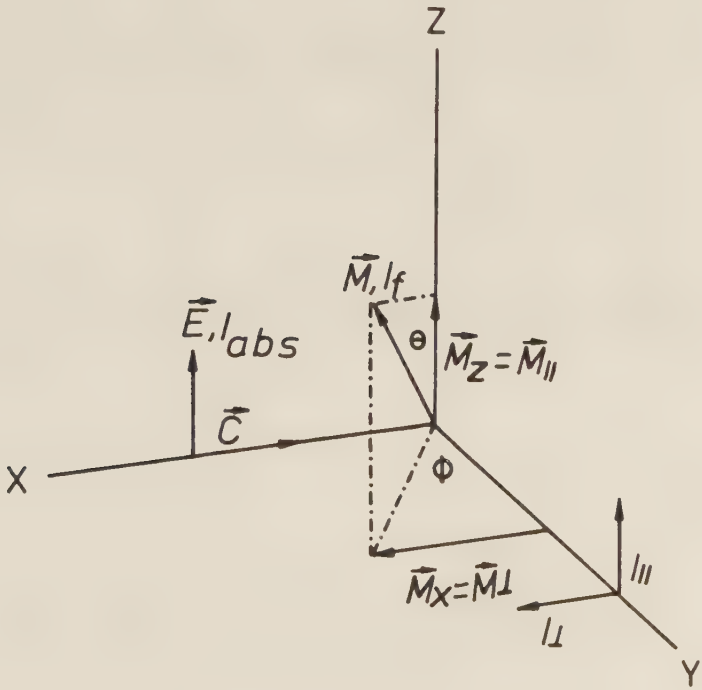


Abb.22 (68)

Polarisiertes Anregungslicht (Intensität I_{abs}, Elektrischer Vektor $\vec{E}$, Geschwindigkeit $\vec{C}$) trifft auf ein fluoreszenzfähiges Molekül. Das Übergangsmoment $\vec{M}$ bildet einen Winkel θ mit der Polarisationsrichtung von $\vec{E}$. Fluoreszenzlicht wird entlang von $\vec{M}$ emittiert. Die Intensität des

$$p = \left(\left(\frac{1}{p_o} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{RT}{\eta}\left(\frac{\tau}{V}\right)\right) + \frac{1}{3}\right)^{-1}$$

Hierbei sind:

R: Gaskonstante (8,3144 J $mol^{-1}K^{-1}$)

T: Temperatur (K)

η: Viskosität (Pa s)

τ: Lebensdauer des angeregten Zustandes

V: Molekulares Volumen

Mit Hilfe dieser Gleichung läßt sich unter geeigneten Versuchsbedingungen (hohe Viskosität, V bekannt) die Lebensdauer τ berechnen.

Auch die Depolarisierung, die auf Energietransfer (ohne Kollisionsvorgänge, ohne Rotationsdepolarisation) beruht, läßt sich berechnen.

$$p = \left(\left(\frac{1}{p_o} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{105NR_o^6c}{a_m^3}\right) + \frac{1}{3}\right)^{-1}$$

N : Avogadro-Zahl

a_m: Effektiver Molekülradius

R_o: Abstand der Dipole bei dem die Wahrscheinlichkeiten füe Emission und Energietransfer gleich groß sind

c : Konzentration (mol/ℓ)

Mit Hilfe dieser Gleichung sind über Polarisationsmessungen molekulare Größen wie a_m und R_o , die für spektroskopische Messungen wichtig sind, zugänglich.

Theoretisch kann p Werte von +1 bis -1 annehmen. Solche extremen Werte werden jedoch nur bei der Emissionspolarisation von orientierten Polymeren gemessen.

In normalen Lösungen sind die Moleküle zufällig orientiert, so daß die Werte von $I_{\parallel}$ und $I_{\perp}$ über alle Werte von θ und ϕ zwischen 0° und 90° gemittelt werden müssen.

Unter der Voraussetzung, daß sich die Moleküle in der Lösung nicht bewegen und daß keine Wechselwirkungen stattfinden, ergeben sich Werte für p (p_o) von +1/2 für parallele Absorptions- und Emissions- Übergangmomente und von -1/3 für senkrecht zueinander stehende Absorptions- und Emissions- Übergangmomente. Bilden Absorptions- und Emissionsübergangmomente einen Winkel β, so ergibt sich für p_o:

$$p_o = (3\cos^2\beta-1)/(\cos^2\beta+3)$$

Diese Werte von p_o werden jedoch nur in sehr verdünnten Lösungen (keine Wechselwirkungen) mit hoher Viskosität (keine Rotation) gefunden.

In Lösungen höherer Konzentration oder mit geringer Viskosität liegen die gefundenen Werte immer niedriger als p_o. In niederviskosen Lösungen führt die spürbare Rotation des Moleküls während der Lebensdauer des angeregten Zustandes zu einem Verlust an molekularer Orientierung und somit zu einem Verlust an Polarisationsgrad der Emission.

Bei höheren Konzentrationen kann der Energietransfer eines angeregten Moleküls auf ein Molekül mit anderer Orientierung zu einem Polarisationsgradverlust führen.
Durch Variation von Viskosität und Konzentration lassen sich Rotationsdepolarisation und Energietransfer-Depolarisation unbeeinflußt voneinander beobachten.
Kann Energietransfer ausgeschlossen werden,wird die Polarisation wie folgt mit der Zähigkeit des Lösungsmittels und damit mit der Diffusion und Rotation der Moleküle verknüpft.

emittierten Lichtes $\vec{M}$, läßt sich ind Komponenten $I_{\parallel}$ (parallel zur Polarisationsrichtung von $\vec{E}$) und in $I_{\perp}$ (senkrecht zur Polarisationsrichtung von $\vec{E}$) zerlegen. ϕ bildet den Azimutwinkel zwischen der Beobachtungsrichtung und $\vec{M}$.

Wenn θ der Winkel zwischen $\vec{M}$ und der Richtung des elektrischen Vektors des anregenden Lichtes ist und ϕ der Azimutwinkel zwischen $\vec{M}$ und der Beobachtungsrichtung, gilt:

$$M_{\parallel} = M\cos\theta$$

und

$$M_{\perp} = M\sin\theta\sin\phi$$

Die Intensitäten des emittierten Lichtes, mit elektrischen Vektoren parallel, bzw. senkrecht zu den elektrischen Vektoren des Anregungslichtes, ergeben sich zu:

$$I_{\parallel} \propto M_{\parallel}^2 = M^2\cos^2\theta$$

und

$$I_{\perp} \propto M_{\perp}^2 = M^2\sin^2\theta\sin^2\phi$$

Der Polarisationsgrad p der Emission wird wie folgt definiert.

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

3.3 Aufbau und Durchführung der Messungen

3.3.1 Aufbau des Mikroskop-Photometers

Zur Durchführung der Messungen stand ein Zeiss Mikroskop-Photometer 03 zur Verfügung. Abbildung 23 zeigt den schematischen Strahlengang dieses "Mikroskopfluorometers".

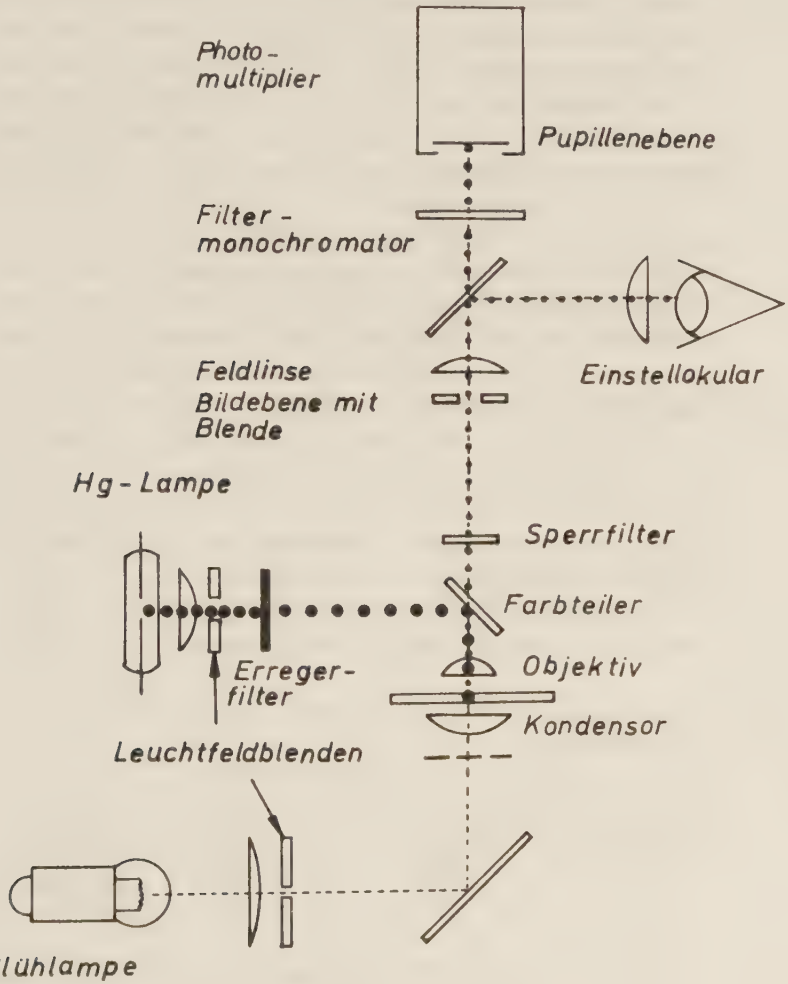


Abb.23 (70)

Der Aufbau des Mikroskops entsprach dem Mikroskop-Photometer UMSP 100 (Zeiss).
Die Fluoreszenzmessungen wurden im Auflichtverfahren durchgeführt. Die Meßempfindlichkeit ist gegenüber der Durchlichtmethode deutlich erhöht, da das Fluoreszenzlicht nicht erst die Probe durchdringen muß, sondern direkt beobachtet werden kann. Dieser Vorteil kann durch den Einsatz von Farbteilern besonders ausgenutzt werden. Farbteiler sind Interferenzfilter, die die bei einer Beleuchtung unter 45° einen Teil des Spektrums nahezu voll reflektieren, andere Wellenlängen aber nahezu vollständig durchlassen. Der Übergang von Reflexion in Transmission kann praktisch an jeder beliebigen Stelle des Spektrums gewählt werden.
Die Anregungswellenlänge betrug 365nm. Als Lichtquelle diente eine stabilisierte Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO 100W/2).
Es war strikt darauf zu achten, daß die Stromversorgung für die Quecksilberlampe als erstes Gerät vor den Messungen eingeschaltet wurde. Der Einschaltvorgang führt zu Spannungsspitzen im Stromnetz, die in der Lage sein könnten, andere angeschlossene Geräte zu zerstören, bzw. deren Sicherungen durchbrennen zu lassen.
Vor der Messung soll die Lampe mindestens 15 Minuten brennen.
Die Mindestbrenndauer liegt bei 30 Minuten. Ein Unterschreiten dieser Zeiten verschlechtert die Bogenstabilität der Lampe und damit die Meßergebnisse.

Durch einen Schieber war es möglich drei verschiedene Erregerfilter-Farbteiler-Sperrfilter- Kombinationen zu wählen.

Filterkombinationen

	I	II	III
Erregerfilter	BP 365/11	BP 405/6	BP 436/8
Farbteiler	FT 390	FT 425	FT 460
Sperrfilter	LP 397	LP 435	LP 470

(BP:Bandpaßfilter z.B. BP 365/11:Durchlaßbereich 365nm, Halbwertsbreite 11nm; FT: Farbteiler; LP:Langpaßfilter mit 50% Transmission bei angegebener Wellenlänge, sehr steile Kante der Durchlaßkurve)

Der Farbteiler lenkt die fluoreszenzanregende Strahlung durch das Objektiv auf die Probe. Das emittierte Licht gelangt über den Farbteiler durch ein zusätzliches Sperrfilter weiter nach oben, wo es entweder zum Binokulartubus, zur eingebauten Kamera oder zum Photomultiplier gelenkt werden kann. Zwischen Sperrfilter und Umlenkmechanismus befindet sich noch ein Photometereinschub, der es ermöglicht durch die Wahl geeigneter Blenden, Teilbereiche des vom Mikroskop entworfenen Bildes für die Messung auszublenden.

Der zwischengeschaltete Sperrfilter sorgt einerseits dafür, daß nur die gewünschte Emission zur Beobachtung gelangt, ist aber andererseits auch zum Schutz der Augen notwendig, um sie bei einer eventuellen Fehlbedienung am Mikroskop vor kurzwelliger UV-Strahlung zu schützen.

An die für solche Messungen verwendeten Objektive werden ganz besondere Anforderungen gestellt. Sie müssen im nahen UV-Bereich gut durchlässig sein, dürfen dabei aber keine Eigenfluoreszenz zeigen. Diese Anforderungen werden von den Objektiven der Serie "Neofluar" der Firma Zeiss erfüllt.

Zwischen Photomultiplierröhre und Photometereinschub befindet sich ein an das Mikroskop angepaßter Gittermonochromator (Zeiss) der das Fluoreszenzlicht in seine monochromatischen Bestandteile zerlegt.

Zur Detektion der nunmehr monochromatischen Anteile der Emission dient der Photomultiplier RCA 8850. Auf diese Weise wird das zunächst äußerst schwache Signal durch Skundärelektronenvervielfachung verstärkt. Wegen möglicher thermischer Emission wird der Photomultiplier gekühlt.

Die Spannungspulse des Photomultipliers werden in einem Photonenzähler (Ortec, Counting System 5 C1) in Normpulse umgewandelt. Die sich für einen bestimmten wählbaren Zeitabschnit ergebenden Pulse werden digital angezeigt und gleichzeitig analog umgewandelt, so daß sie von einem x-t-Schreiber aufgezeichnet werden können.

3.3.2 Vorbereitung der Proben

Zunächst werden die für eine Versuchsreihe benötigten Deckglaskulturkammern, wie bereits oben beschrieben , montiert. Da bei dem Einfüllen der Lösungen oder beim Absaugen gelegentlich die Deckgläser von den Kammern fallen, achte man stets darauf einige komplette Kammern in Reserve zu halten.

Die auf Vorrat gehaltenen Zellkulturen werden in Ihren Kulturflaschen wie üblich trypsiniert und in Medium aufgenommen und auf neue Flaschen verteilt. Mit dieser Zellsuspension wird nun auch eine Spritze (10ml) mit Hilfe einer langen Kanüle (12cm) gefüllt. Aus dieser Spritze werden nun alle für eine Versuchsreihe notwendigen Deckglaskulturkammern gefüllt. Sollte es sich ergeben, daß 10ml Zellsuspension für eine Versuchsreihe nicht genügen, muß auf ein größeres Spritzenvolumen zurückgegriffen werden. Auf diese Art ist eine bessere Gleichverteilung der Zellen auf die einzelnen Kammern gegeben. Diese Arbeiten sollen möglichst kontinuierlich durchgeführt werden. Ein Absetzen der Zellen in der Suspension ist zu vermeiden.

Das Befüllen der Kammern mit großer Spritze und sehr kleinen Kanülen sollte vor den ersten Versuchen geübt werden.
Die so gefüllten Deckglaskulturkammern werden mit dem Deckglas nach unten in kleine Petrischalen gehängt und wie üblich im Brutschrank bebrütet.

Die Versuche werden an Zellkulturen durchgeführt, bevor diese konfluent gewachsen sind. Der geeignete Zeitpunkt liegt, je nach Zellart, zwischen 1 und 5 Tagen nach der Passage.
Da der Zustand der Zellkulturen in den Deckglaskulturkammern den Zeitpunkt der Untersuchungen bestimmt, müssen die Kammern mindestens einmal täglich kontrolliert werden.

3.3.3 Durchführung der Messungen

Der Kreuztisch des Mikroskopes wird von Schrittmotoren angetrieben und kann über einen kleinen Steuerknüppel fernbedient werden. Es ist notwendig, den Kreuztisch vor der Probenaufgabe auf 37°C zu beheizen, da sonst die Kulturkammer zu schnell abgekühlt werden könnte. Das Erwärmen geschieht mit einem Heizgebläse dessen Thermofühler direkt am Kreuztisch befestigt wird. Die Temperaturschwankungen liegen unter 0,1°C.

Die Deckglaskulturkammer wird mit dem Deckglas nach oben auf den Kreuztisch gelegt. Im Durchlicht wird nun bei kleinster Vergrößerung die Schärfeebene eingestellt und mit dem geeigneten Objektiv (meistens 20-fach) das Bild einer Zelle scharf eingestellt. Durch den Photometereinschub wird nun eine Blende derart eingeschoben, daß nur ein bestimmter Bereich der Zelle sichtbar bleibt.

Der Gittermonochromator wird (motorisch) auf 420nm eingestellt.
Die Durchlichtbeleuchtung wird abgestellt.
Über eine Fernbedienung wird der Schreiber gestartet und kurz danach das Anregungslicht auf die Probe freigegeben.
Bei Fluoreszenz ergibt sich ein eindeutiger Peak.
Die Messung sollte keinesfalls länger als einige Sekunden dauern, um eine Schädigung der Probe zu vermeiden.
Nachdem der Lichtweg für das Anregungslicht versperrt ist, sucht man im Durchlicht eine Stelle der Probe, die möglichst frei ist von Zellmaterial. An dieser Stelle wird nun erneut die Fluoreszenzintensität bei 420nm gemessen um einen Wert für den Untergrund zu erhalten.

Nach Abschluß dieser Messung wird die Probe sofort wieder in den Brutschrank gestellt.

Innerhalb einer Meßreihe darf weder die Vergrößerung noch die Größe der Meßblende verändert werden.

3.3.4 Nachteile der Meßanordnung

Mit dem beschriebenen Aufbau des Photomikroskops 03 kann man über die relativen Fluoreszenzintensitäten bei bestimmten Wellenlängen,Aussagen über relative Konzentrationen einzelner Substanzen machen. Ein Fluoreszenzspektrum läßt sich von vielen Substanzen und von biologischem Material jedoch praktisch nicht erhalten.

Ein Grund dafür, warum zumindest kein sinnvolles Spektrum erhalten werden kann, ist der sogenannte "Fading Effekt".

Fading Effekt bedeutet, daß viele Farbstoffe und biologische Materialien unter dem Einfluß von UV-Strahlung ausbleichen. Abb.24 zeigt am Beispiel einer konkreten Messung den Fading Effekt des akkumulierten 3,4-Benzpyrens in einer menschlichen Zelle. Die Anfangsintensität der Fluoreszenz wird hier gleich 100 gesetzt.

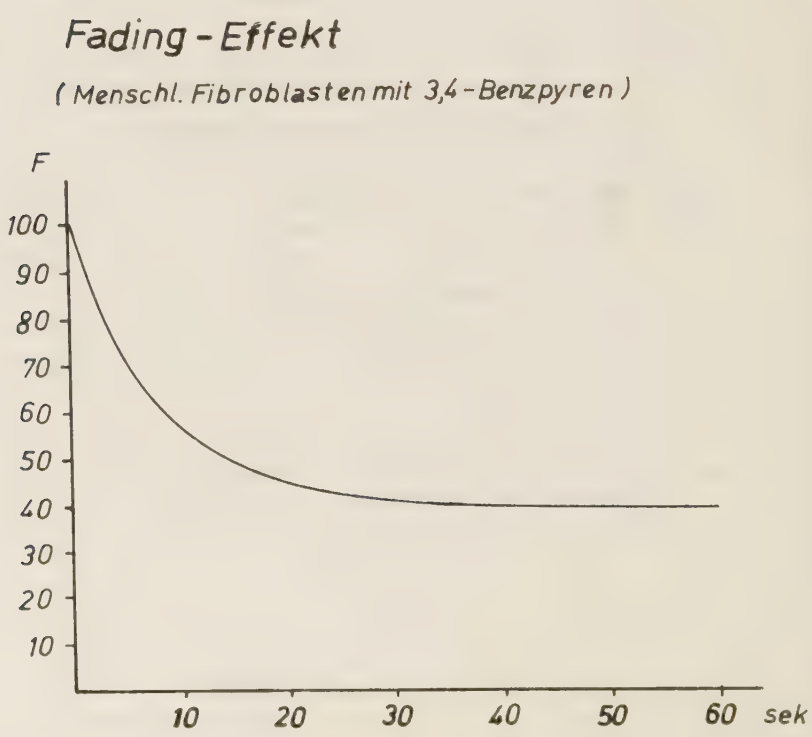


Abb. 24

Diese Schwierigkeit kann dadurch behoben werden, daß man Anregungs- und Meßzeit verkürzt. Gelangt man in den Bereich einiger Millisekunden für Anregungs und Meßzeit, mit Intervallen von etwa 10 Sekunden, spielt der Fading-Effekt selbst bei mehrfach wiederholten Messungen der gleichen Probe, praktisch keine Rolle mehr (71). Mit Rechner und Schaltfolgesteuerung sind derartige Messungen möglich. Ein weiterer Vorteil dieser Meßanordnung ist, daß das Verschieben der ganzen Hebel und die Umschaltungen, die bei Einzelmessungen notwendig sind, entfallen.

Ein weiterer Grund dafür, daß die erhaltenen Spektren wenig aussagekräftig sind ist der, daß die Spektren nicht korrigiert sind. Alle optischen Teile, durch die das emittierte Licht bis zum Photomultiplier passieren muß zeigen ein bestimmtes Absorptionsverhalten. Auch der Photomultiplier selbst zeigt ein charakterristisches Empfindlichkeitsspektrum. Der hier verwendete Typ, RCA 8850, hat ein Empfindlichkeitsmaximum bei etwa 400nm.

Generell ist es jedoch möglich, das Mikroskop zu eichen. Die sogenannte Emissivity eines Wolframdrahtes, das ist das Verhältnis der spektralen Strahldichte eines Wolframdrahtes zu der eines schwarzen Körpers, läßt sich berechnen (72). Abbildung 25 zeigt den Kurvenverlauf für die Emissivity (E) für einen Wolframdraht bei einer Farbtemperatur von 3050 K.

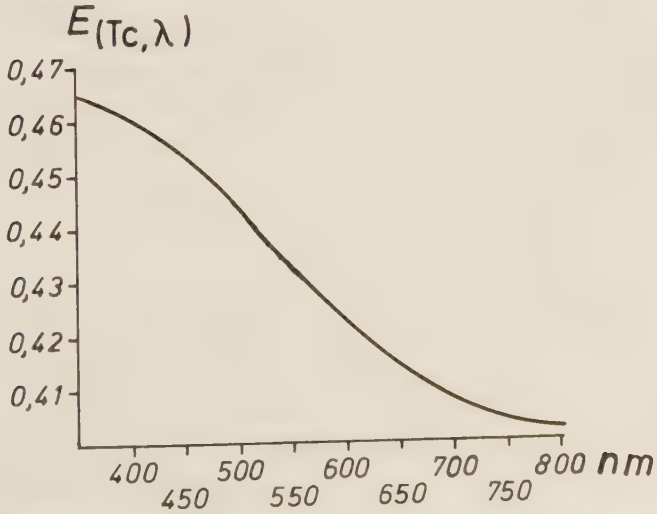


Abb. 25

In das Mikroskop ist für Durchlichtzwecke eine Wolframlampe eingebaut. Bei einer angelegten Spannung von 12V hat der Faden dieser Lampe eine Lichttemperatur von 3050 K.

Mit Hilfe der berechneten Werte aus der Kurve und unter Berücksichtigung der Reflexionen am Lampenkolben könnte somit ein Eichspektrum des Mikroskops geschaffen werden. Dieses Spektrum könnte in einem Rechner abgespeichert werden, der dann die Meßdaten korrigiert und somit in der Lage wäre korrigierte Spektren zu liefern.

Zum Zeitpunkt der Messungen war diese Ausrüstung nicht vorhanden. Die Korrektur der erhaltenen Spektren war somit nicht möglich.

Dennoch bieten die Werte, die jeweils bei den Messungen mit einer Wellenlänge erhalten wurden die Möglichkeit verschiedene Konzentrationen in einer Probe zueinander in Relation zu setzen. Die Meßanordnung darf dann natürlich innerhalb einer Probenreihe nicht verändert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Gegensätzliche Einflüsse von TPA und Serum auf die Akkumulation von 3,4-Benzpyren in Säugerzellen

4.1.1 Versuchsbedingungen

Zellen:

1. Menschliche Fibroblasten GM 3349 (Institute of Medical Research, Camden, N. Y.)
2. Epithelialzellen, Fledermauslunge, CCL 88 (Flow Laboratories, Bonn)
3. Menschliche embryonale Hautzellen FH 114 (Seromed/Biochrom, Berlin)
4. Menschliche embryonale Lungenzellen FH 99 (Seromed/Biochrom, Berlin)

Die Zellen waren mycoplasmafrei.
Zellmedium: HAM F 12 (Gibco Europe, Karlsruhe) / 12% fötales Kälberserum (Seromed/Biochrom, Berlin) unter Zusatz von Antibiotika/Antimycotika-Lösung (Penicillin, Streptomycin, Fungizone, Kat.Nr. 043-5240, Gibco)

Lösungen:

3,4-Benzpyrenlösungen:
Eine bei 25°C gesättigte Lösung von 3,4-Benzpyren (Roth, Karlsruhe) in Glycerin (p.a., Merck, Darmstadt) wurde 1:7 verdünnt, resultierend in einer 10^{-6}M BP-Lösung.
a) 0,125ml gesättigte Lösung + 0,875ml HAM F12
b) 0,125ml gesättigte Lösung + 0,875ml HAM F12 serumhaltig

Die TPA-Stammlösung enthielt 0,6mg TPA (Paesel, Frankfurt/M) in 1ml DMSO (Merck, Darmstadt); kurz vor der Messun wurde die Stammlösung so mit HAM F 12 verdünnt, daß die Lösung 10^{-6}M TPA enthielt (≙ 0,1% DMSO).

Zur Messung wurden die Zellen in Deckglaskulturkammern (Greiner, Nürtingen) angezüchtet.

Die Akkumulation von 3,4-Benzpyren in Zellen kann mit dem Fluoreszenzmikroskop leicht beobachtet werden, da nicht akkumulierende Zellen praktisch nicht fluoreszieren und sich somit nicht vom fluoreszierenden Untergrund des 3,4-Benzpyrens im Medium abheben. Akkumulierende Zellen heben sich durch eine leuchtende Fluoreszenz von diesem Untergrund ab.

Der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen Untergrund und akkumulierender Zelle wurde als Maß für die Akkumulation genommen.

Die Zugabe der TPA- und 3,4-Benzpyrenlösungen zu den Deckglaskulturkammern erfolgte mit Mikrolitersprizen (Mediumvolumen 0,2ml).

Die 3,4-Benzpyrenakkumulation in Zellen wurde unter folgenden Bedingungen beobachtet:

a) In Medium (Ham F12) mit 12% fötalem Kälberserum: 0,05ml des Mediums der Kulturkammer wurden durch 3,4-Benzpyrenlösung ersetzt (serumhaltig), dadurch ergab sich eine $3x10^{-7}$M BP-Lösung.
b) In Medium (Ham F12) serumfrei: Das ursprünglich serumhaltige Medium der Kammer wurde ersetzt durch 0,15ml Ham F12 ohne Serum. Danach wurde 5 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend Zugabe von 0,05 ml 3,4-Benzpyrenlösung ohne Serum.
c) In Medium (Ham f12) mit TPA ohne Serum: Das serumhaltige Medium der Deckglaskulturkammer wurde ersetzt durch 0,15ml serumfreies Medium, das 10^{-6}M TPA enthielt. 5 min. Inkubation bei 37°C. Zugabe von 0,05ml 3,4-Benzpyrenlösung serumfrei.
d) In Medium (Ham F12) mit Serum und TPA: Das Medium der Deckglaskulturkammer wurde ersetzt durch 0,15ml Medium mit 12% Serum und 10^{-6}M TPA. 5 min. Inkubation bei 37°C. Zugabe von 0,05ml 3,4-Benzpyrenlösung serumhaltig.

5 Minuten nach Zugabe der 3,4-Benzpyrenlösung begannen die Intensitätsmessungen. Die nachfolgenden Messungen erfolgten nach 15 bzw. 25 Minuten und danach in größeren Intervallen.

Nach mehr als 6 Stunden waren die Ergebnisse nicht mehr reproduzierbar.

Um für jeden Zeitabschnitt mehr als einen Meßwert zu erhalten, wurden jeweils 4 Deckglaskulturkammern mit identischen Lösungen befüllt. Die 3,4-Benzpyrenzugabe erfolgte im Abstand von ca. 1 Minute. Die Messungen erfolgten in gleichen Zeitabständen, so daß die Meßpunkte auf den Abbildungen 26 bis 29 Mittelwerte darstellen.

Die Kurven innnerhalb einer Abbildung, die Kurven für einen Zelltyp also, wurden alle aus Deckglaskulturkammern erhalten, die zur gleichen Zeit befüllt wurden, so daß die Eigenschaften dieser Zellen identisch waren.

4.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Aus den Abbildungen 26-29 geht hervor, daß TPA eine höhere 3,4-Benzpyrenakkumulation in verschiedenen Säugerzellen verursacht, wenn kein Serum vorhanden ist. Der größte Effekt zeigt sich bei den hier verwendeten Zellinien bei der etablierten Linie GM 3349. Kein eindeutiger Effekt ist bei den Zellen zu sehen, die aus Primärkulturen gewonnen wurden (menschlich embryonal Lunge und Haut). Die Anzahl der bei dieser Arbeit untersuchten Zellinien ist jedoch zu gering, um allgemeingültige Aussagen über das Verhalten verschiedener Zelltypen treffen zu können. Dies ist auch nicht Ziel dieser Arbeit.

Aber die Ergebnisse zeigen, daß in einigen Fällen die Aufnahme von 3,4-Benzpyren von TPA stimuliert wird.

Es ist bekannt, daß TPA die Aufnahme von Deoxyglucose (73), Zucker (74) und Aminosäuren (75) stimulieren kann. Es ist allerdings zu vermuten, daß das Eindringen von 3,4-Benzpyren in die Zelle durch andere Mechanismen hervorgerufen wird als das Eindringen von Kohlenhydraten und Aminosäuren.

Ein bestimmender Faktor für die Aufnahme von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, wie 3,4-Benzpyren, ist wohl das Verteilungsgleichgewicht für diese Substanzen zwischen Medium und Zelle.

Die Abbildungen zeigen, daß unter allen hier gewählten Versuchsbedingungen, 3,4-Benzpyren in den Zellen akkumuliert wird. Es zeigt sich allerdings eine deutliche Abhängigkeit vom Serumgehalt der Kultur (76). Wenn kein Serum im Medium vorhanden ist, ist die 3,4-Benzpyrenakkumulation wesentlich stärker als wenn das Medium 12% Serum enthält.

Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung von Bertram (77), der herausfand, daß ein Gehalt von 10 bis 20% Serum die Transformation von C3H/10T$\frac{1}{2}$ Zellen durch kanzerogen Kohlenwasserstoffe verhindert.

Der Einfluß des Serums auf die 3,4-Benzpyrenakkumulation in Zellen kann teilweise dadurch erklärt werden, daß das Serum die Bedingungen für das Verteilungsgleichgewicht für das 3,4-Benzpyren zwischen Medium und Zelle verändert.

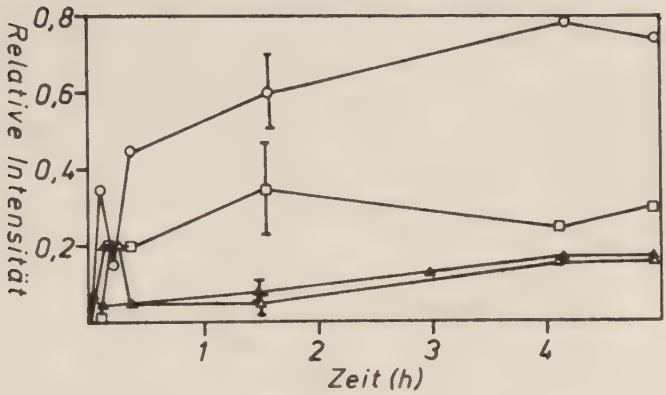


Abb. 26 Menschliche Fibroblasten GM 3349, 14. Passage

△ Ham F12 mit 12% Serum; □ Ham F12 ohne Serum;

○ Ham F12 mit TPA (10^{-6}M), serumfrei;

▲ Ham F12 mit TPA (10^{-6}M), serumhaltig (12%)

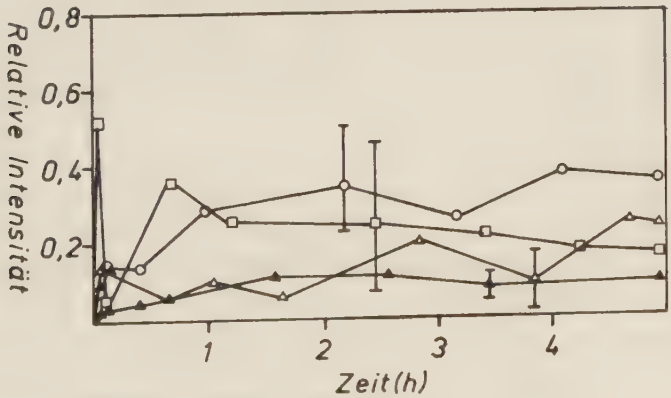


Abb. 27 Menschlich, embryonal, Haut, 11. Passage

△ Ham F12 mit 12% Serum; □ Ham F12 ohne Serum;

○ Ham F12 mit TPA (10^{-6}M), serumfrei;

▲ Ham F12 mit TPA (10^{-6}M), serumhaltig (12%)

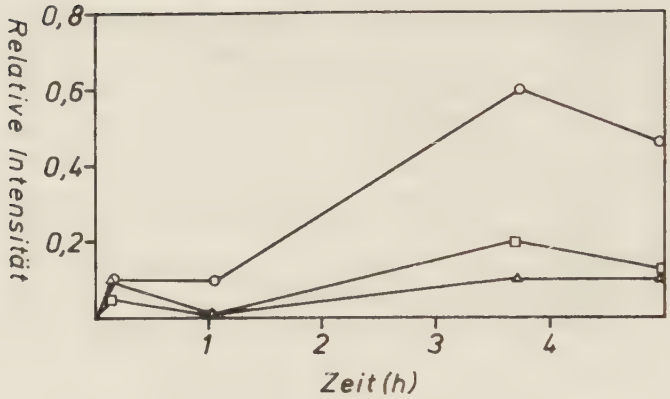


Abb. 28 Fledermaus, Lunge, epithelial, NBL 12, CCL 88 , 33.P.

△ Ham F12 mit 12% Serum; □ Ham F12 ohne Serum

○ Ham F12 mit TPA (10^{-6}M), serumfrei;

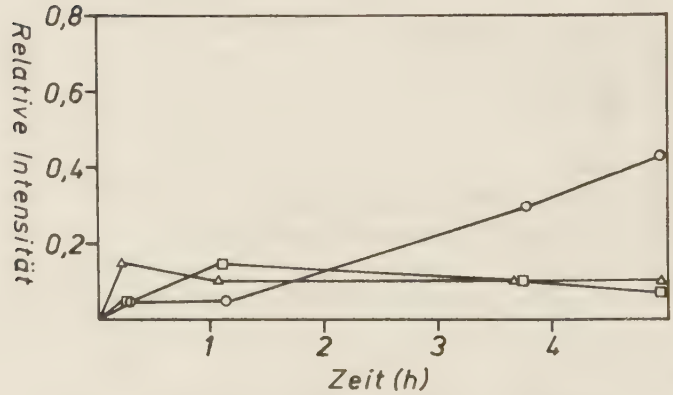


Abb. 29 Menschlich, embryonal, Lunge, 4. Passage

△ Ham F12 mit 12% Serum; □ Ham F12 ohne Serum

○ Ham F12 mit TPA (10^{-6}M), serumfrei;

Die in Serum enthaltenen Lipoproteine erhöhen die Löslichkeit lipophiler Substanzen, wie 3,4-Benzpyren, so daß das Verteilungsgleichgewicht zu höheren Konzentrationen im Medium und niedrigeren Konzentrationen in der Zelle verschoben wird.

Dies kann allerdings nicht der einzige Mechanismus sein, der im Serum dafür verantwortlich ist, daß 3,4-Benzpyren weniger stark in Zellen akkumuliert wird. Wie oben gezeigt werden wird, gibt es eher hydrophile Bestandteile des Serums, die ähnlich wie das komplette Serum die Akkumulation von 3,4-Benzpyren in Zellen verringern (78).

Betrachtet man die die Einflüsse, die TPA hervorruft, ist wiederum der Serumgehalt des Mediums bestimmend für die 3,4-Benzpyren - Akkumulation. Wenn das Medium 12% Serum,enthielt war kein Einfluß des TPA auf die 3,4-Benzpyren Aufnahme zu beobachten. Dies trifft für alle Zelltypen zu,die untersucht wurden, auch wenn die entsprechenden Kurven nicht in Abbildung 28 und 29 dargestellt sind. Für diese Fälle wurden die Zellen getrennt untersucht und hatten somit eine andere Passagenzahl.

Wie bereits erwähnt, verstärkt bereits das Fehlen von Serum im Medium die Aufnahme von 3,4-Benzpyren. TPA verursacht einen weiteren Anstieg der 3,4-Benzpyrenaufnahme (Abb. 26 bis 29).

Phorbolester-Tumorpromotoren, wie TPA, werden an Oberflächenrezeptoren der Zelle gebunden und hindern gleichzeitig die Bindung von "Epidermal Growth Factor" (EGF) (79,80,81). Die Bindung von TPA wiederum wird von einigen Substanzen behindert. 3,4-Benzpyren gehört zu diesen Substanzen,und Horowitz et al. (79) berichteten, daß biologische Flüssigkeiten, wie Human- oder Kälberserum, einen oder mehrere weitere unbekannte Inhibitoren beinhalten.

Es gibt einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen Inhibitoren und den hier berichteten Serumeffekten, aber der Mechanismus der Hinderung ist noch nicht bekannt.

Horowitz et al. halten es für wichtig, herauszufinden, ob dieser inhibitorische Faktor des Serums biologische Effekte, ähnlich denen von Phorbolestern, hervorruft, oder ob er als Antagonist für diese Tumopromotoren wirkt.

Die hier gefundenen Ergebnisse legen hinsichtlich der 3,4-Benzpyrenakkumulation die Annahme eines antagonistischen Effekts nahe.

Eingeschränkt wird diese Aussage durch das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Zelltypen (siehe Abb. 26-29), unterschiedliche Effekte bei verschiedenen Serumpräparationen (82) und durch die Tatsache, daß die hier berichteten Beobachtungen sich nur auf die Anfangsphase der Wechselwirkungen mit TPA beziehen. Über den Langzeit-Einfluß von Serum auf TPA wird von Hennings et al. (83) berichtet.

Magun et al. (84) vermuteten, daß die Fähigkeit von TPA, die DNS-Synthese synergistisch mit dem EGF zu induzieren, obwohl die Bindung an zelluläre Rezeptoren zunächst antagonistisch ist, darauf beruhe, daß TPA die EGF-Affinität nur vorübergehend verringern kann.

Die Rezeptoraffinität zu EGF wird mit der Zeit wieder hergestellt, so daß dann die die EGF-Konzentration in Zellen, die mit TPA behandelt wurden, größer wäre als in Kontrollzellen.

Jedoch können sich die hier gefundenen Ergebnisse nicht auf Langzeit-Einflüsse von TPA beziehen, sie betreffen die Wechselwirkungen während der ersten 6 Stunden.

4.2 HEMMUNG DER AUFNAHME VON 3,4-BENZPYREN IN ZELLEN DURCH POLYAMINE

4.2.1 VERSUCHSBEDINGUNGEN

Zellen:

1. Epithelialzellen, Fledermauslunge, CCL 88, (Flow Laboratories, Bonn)
2. Epithelialzellen, Chinesischer Hamster, CHOK1, CCL 61, (Flow Laboratories, Bonn)
3. Menschliche Haut, (Seromed/Biochrom, Berlin)
4. Menschliche Embryonalzellen, (Seromed/Biochrom, Berlin)

Die Anzucht der Zellen erfolgte für alle Versuche unter denselben Bedingungen.

Lösungen:

Die 3,4-Benzpyrenlösungen wurden für die entsprechenden Versuche identisch angesetzt.

Die Polyamine (Putreszin-dihydrochlorid, Spermidin-trihydrochlorid, Spermin-tetrahydrochlorid (Sigma, München)) wurden in Ham F12 gelöst (0,1mg in 1ml, pH 7,0)

Zur Messung wurden die Zellen in Deckglaskulturkammern angezuchtet.

Die Zugabe der 3,4-Benzpyren- und der Polyaminlösungen erfolgte mit Mikrolitterspritzen.

Die Akkumulation von 3,4-Benzpyren wurde unter folgenden Bedingungen beobachtet:

a) In Medium (Ham F12) mit 12% fötalem Kälberserum: 0,05ml des Mediums der Kulturkammer wurden durch 3,4-Benzpyrenlösung (serumhaltig) ersetzt
b) In Medium (Ham F12) serumfrei: Das ursprünglich serumhaltige Medium der Kammer wurde ersetzt durch 0,15ml Ham F12 ohne Serum. Danach wurde 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend Zugabe von 0,05ml 3,4-Benzpyrenlösung (srumfrei)

c) In Medium (Ham F12) mit Polyaminzusatz, serumfrei:
Das Medium dieser Kammern wurde ersetzt durch 0,15ml polyaminhaltiges, serumfreies Medium (Ham F12). Inkubation bei 37°C für 5 min. Zugabe von 0,05ml 3,4-Benzpyrenlösung, serumfrei.

5 Minuten nach der Zugabe von 3,4-Benzpyrenlösung erfolgte die erste Messung. Weitere Messungen folgten nach 15 bzw. 25 Minuten. Die nachfolgenden Messungen erfolgten in größeren Zeitabständen. Mehr als 6 Stunden nach Zugabe der 3,4-Benzpyrenlösung wurden die Messungen unreproduzierbar.

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin kommen in bemerkenswerten Mengen praktisch überall im Gewebe eines lebenden Organismus vor (85). Sie stabilisieren Ribosomen und Nukleinsäuren und wirken bei der Nukleinsäuresynthese mit (86). Sie spielen eine wichtige Rolle bei schnell wachsenden Geweben, was durch den starken Anstieg der Ornithindecarboxylaseaktivität bei sich regenerierendem Gewebe angezeigt wird. Ornithindecarboxylase (ODC) ist ein Enzym, das Putrescin, die unmittelbare Vorstufe zu Spermidin, bildet und einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Polyaminsynthese katalysiert. Vor dem Anstieg der DNS- und RNS- Synthese steigt die ODC- Aktivität an (87). Es wurde beobachtet, daß Tumorpromotoren wie Phorbolester die ODC- Aktivität stimulieren (88,89,90). TPA verursacht ein Anwachsen der Putrescin-, Spermidin- und Sperminkonzentration in Rattenleber (91).

Es wurde vermutet, daß die Induktion von ODC ein rischer Schritt bei der Karzinogenese der Mäusehaut sein könne (92).

ODC scheint ein kritisches Enzym bei der Kontrolle des Zellwachstums zu sein. Clark und Fuller (93) zeigten, daß in 3T3-Zellen die Regulation der ODC-Aktivität über Putrescin und Spermidin erfolgt: Exogenes Putrescin und Spermidin (10^{-4}M), das von den Zellen aufgenommen wird, kann die ODC-Synthese hindern.

Dies steht in Einklang mit den Beobachtungen von Kallistratos (94), daß die Injektion von 3,4-Benzpyren zusammen mit Putrescin in Mäuse keine Tumore hervorrief, ganz im Gegensatz zu Injektionen von 3,4-Benzpyren alleine, was in jedem Fall Tumore hervorrief.

Zellen akkumulieren 3,4-Benzpyren ziemlich stark, wenn kein Serum vorhanden ist. Die Gegenwart von Serum im Medium verringert diese Akkumulation beträchtlich (95), wie aus den Abbildungen 26 - 29 ersichtlich ist.

Einen ähnlichen Effekt, wie ihn das Serum hervorruft, verursachen die Polyamine. Abbildungen 30-33.

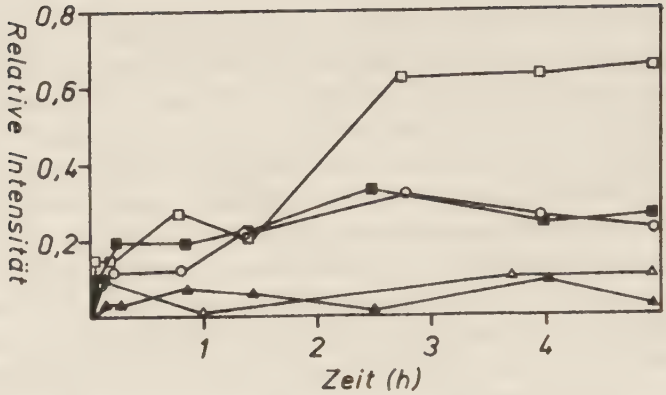


Abb. 30 Fledermauslunge, epithelähnlich, CCL 88, 42. Passage

△ : serumhaltiges Medium; □ :serumfreies Medium;

○ : serumfreies Medium + Putreszin;

▲ : serumfreies Medium + Spermin;

■ : serumfreies Medium + Spermidin

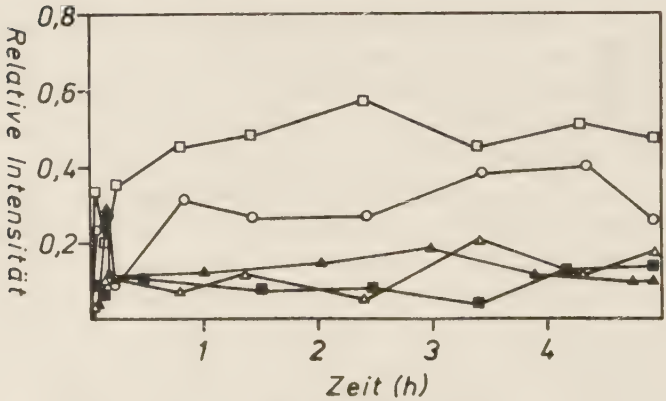


Abb. 31 Menschliche Haut, 5.Passage

△ : serumhaltiges Medium; □: serumfreies Medium;

○ : serumfreies Medium + Putreszin;

▲ : serumfreies Medium + Spermin;

■ : serumfreies Medium + Spermidin

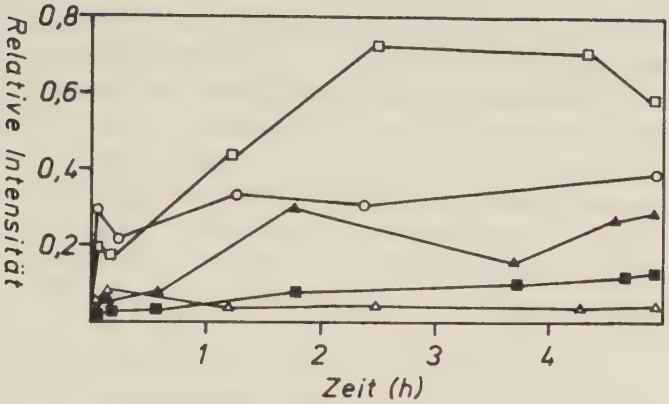


Abb. 32 Menschlich, embryonal, 10. Passage

△ : serumhaltiges Medium; □: serumfreies Medium;

○ : serumfreies Medium + Putreszin;

▲ : serumfreies Medium + Spermin

■ : serumfreies Medium + Spermidin

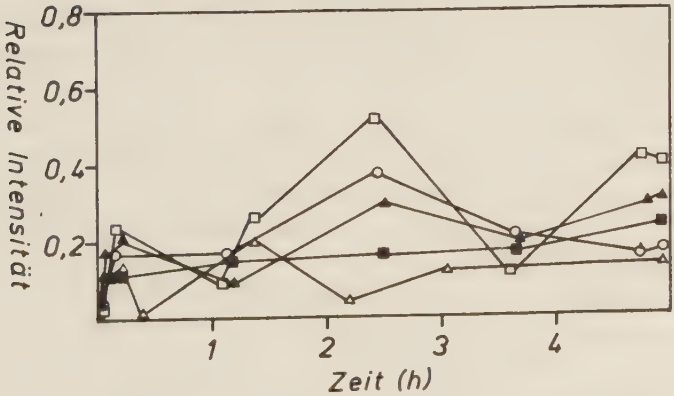


Abb. 33 Chinesischer Hamster, epithelähnlich, CHOK 1, CCL 61, 89. Passage

△ : serumhaltiges Medium; □: serumfreies Medium;

○ : serumfreies Medium + Putreszin;

▲ : serumfreies Medium + Spermin;

■ : serumfreies Medium + Spermidin

Geringe Mengen Putrescin sind auch in normalem Medium (Ham F12) enthalten. Die Konzentrationen beider Polyamine bei diesen Untersuchungen übersteigen die Konzentration von Putrescin in normalem Medium um das 10^3-fache. Dennoch mag dieser Putrescingehalt in Ham F12 der Grund dafür sein, daß der Effekt von zusätzlichem Putrescin gelegentlich nicht so deutlich wird wie bei Spermidin oder Spermin.

Diese Wirkungen der Polyamine sind in zweierlei Hinsicht interessant, erstens hinsichtlich der Hinderung der Tumorgenese, wie sie von Kallistratos (92) berichtete,und zweitens hinsichtlich der Interpretation des "Serumeffekts".

Der Effekt, daß Polyamine die Aufnahme von 3,4-Benzpyren in Zellen behindert, zeigt, daß das Modell des Verteilungsgleichgewichtes (da Serum die Löslichkeit von 3,4-Benzpyren im Medium erhöht, wird es weniger akkumuliert) zu einfach ist, um alle Aspekte der 3,4-Benzpyrenakkumulation zu erklären. Bei pH 7 ,0 im Kulturmedium liegen die Polyamine überwiegend in ihrer Ionenform vor und haben somit eher hydrophile als lipophile Eigenschaften.
Es ist unklar,wie Polyamine die 3,4-Benzpyrenaufnahme in Zellen behindern. Da Polyamine auch im Serum vorhanden,sind ist es möglich, daß ein Teil der beobachteten Serumeffekte auf diesen Substanzen beruht.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden geeignete Methoden entwickelt, um den Einfluß von TPA und Polyaminen auf die Akkumulation von 3,4-Benzpyren in Säugerzellen beobachten zu können.

Durch Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie und spezieller Deckglaskulturkammern konnte gezeigt werden, daß TPA die Aufnahme von 3,4-Benzpyren in lebende Säugerzellen dann beschleunigt, wenn das Medium der Zellen serumfrei ist.
Das Fehlen von Serum im Medium führt selbst bereits zu einer verstärkten 3,4-Benzpyrenakkumulation,verglichen mit serumhaltigem Medium.

Die Gegenwart von TPA in serumfreien Medium führt zu einer weiteren Beschleunigung der 3,4-Benzpyrenaufnahme.

Wenn das Medium Serum und TPA enthält, verursacht TPA keinen Anstieg der 3,4-Benzpyrenakkumulation.

Der beobachtete Effekt ist bei den menschlichen embryonalen Zellinien (Lunge und Haut) weniger deutlich zu erkennen als bei den etablierten Zellinien Menschliche Fibroblasten GM 3349 und Fledermauslunge NBL 12, CCL 88.

Mit den gleichen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie an Zellen in Deckglaskulturkammern wurden die Effekte beobachtet,die die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin auf die 3,4-Benzpyrenakkumulation in lebende Säugerzellen ausüben.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Verabreichung von TPA die Konzentration dieser Amine in Rattenleber erhöht.

Die Konzentration dieser Amine in Gewebe ist wiederum eng verknüpft mit der Ornithindecarboxylaseaktivität.

Ornithindecarboxylase scheint ein kritisches Enzym bei der Wachstumskontrolle der Zellen zu sein.

Wird 3,4-Benzpyren zusammen mit Putrescin an Mäuse verabreicht, ergeben sich keine Tumore.

Es konnte gezeigt werden, daß die Polyamine Putrescin, Spermidin und Spermin eine hemmende Wirkung auf die Akkumulation von 3,4-Benzpyren in lebende Säugerzellen ausüben:

Bei Gegenwart dieser Amine wird 3,4-Benzpyren wesentlich schlechter in den Säugerzellen akkumuliert als in serumfreiem Medium (Ham F12).

Diese Tatsache ist von Bedeutung auch in Hinblick auf die Frage, ob das Eindringen von 3,4-Benzpyren in Zellen ein aktiver Transportprozeß oder ein einfacher Diffusionsvorgang ist. Im letzteren Falle wäre z.B. der Einfluß von Serum im Medium auf die Benzpyrenakkumulation in Zellen einfach durch die Beeinflussung des Verteilungsgleichgewichtes erklärbar. Diese Beeinflussung beruht darauf, daß Serum lipophile Substanzen enthält und damit seine Anwesenheit im Medium die Löslichkeit des lipophilen 3,4-Benzpyrens im Medium erhöht. Bei den Polyaminen wird dieser einfache Mechanismus hier jedoch nicht angenommen, da sie bei pH 7 vorwiegend in der hydrophilen Ionenform vorliegen. Ihre Wirkung als Inhibitoren der Benzpyrenaufnahme ist daher ein Hinweis darauf, daß aktive Prozesse für den Transport von 3,4-Benzpyren durch die Zellmembran diskutiert werden müssen.

LITERATURVERZEICHNIS

1) Pott, P.,
Chirurgical Observations 1775
Reprint: Nat. Cancer Inst. Monogr. 10, 7-13, (1963)

2) Yamagiwa, K., Ichikawa, K.,
Mitt. Med. Fak. Tokio, 15, 295, (1915)
J. Cancer Res. 3, 295, (1918)

3) Kennaway, E.L.,
Path. Bact. 27, 233-238, (1924)

4) Cook, J.W., Hewett, C.L., Hieger, J.,
J. chem. Soc. 395-405, (1933)

5) Kühn, M., Tomingas, R.,
Staub, 25, Nr.3, 86-98, (1965)

6) Kandus, J., Mašek, V.,
Zentralblatt für Arbeitsmedizin u. Arbeitsschutz, Heidelberg
22, Nr. 5, 138-141, (1972)

7) Zdražil, J., Pîcha, F.,
Pracovní lékařství, Prag
15, Nr. 5, 207-211, (1963)

8) Kutscher, W., Tomingas, R.,
Staub Reinhalt. Luft, 29, Nr.1, 18-21, (1969)

9) Chemie und Umwelt "Wasser" VCI
44 (1982)

10) Fleischverordnung in der Neufassung vom 21.01.82
BGBl I S. 89 § 1 Abs. 2

11) Trinkwasserverordnung in der Fassung vom 25.06.80
BGBl 1, S. 764, Anlage 1 zu § 3, 1

12) Borneff, J., Kunte, H.,
Die Trinkwasserverordnung, Einführung und Erläuterung
für Wasserversorgungsunternehmen u. Überwachungsbehörden
K., Aurand, U., Hässelbarth, G., Müller, W., Schumacher,
W., Steuer, Hrsg., Verlag E. Schmidt, Berlin (1976)

13) Gräf, W., Erff, H., Schormair, S.,
Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt., 161, 85-103, (1975)

14) Fritz, W.,
Ernährungsforsch., 16, 547-557, (1971)

15) Bauer, K.H.,
Arch. klin. Chir., 189, 123-184, (1937)

16) Bauer, K.H., Rarei, B., Gummel, H.,
Arch. klin. Chir., 193, 499-502, (1938)

17) Pullman, A.,
Bull. Cancer, 33, 120-130, (1946)

18) Pullman, A., Pullman, B.,
Adv. Cancer Res., 3, 117-169, (1955)

19) Boyland, E., Green,B.,
Br. J. Cancer, 16, 347-360, (1962)

20) Arcos, J.C., Argus, M.F.,
Adv. Cancer Res., 11, 305-471, (1968)

21) Miller, J.A.,
Cancer Res., 30, 559-576, (1970)

22) Miller, J.A., Miller, E.,
Chemical Carcinogenesis A, 61-85
Marcel Dekker Inc. N.Y. (1974)

23) Borgen, A., et al.,
J. med. Chem., 16, 502-506, (1973)

24) Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K.,Hewer, A.,
Nature, 252, 326-328, (1974)

25) Yagi, H., Hernandez, O., Jerina, D.M.,
J.A.C.S., 97, 6881-6883, (1975)

26) Jerina, D.M., Daly, J.W.,
Drug Metabolism, 13-32
Taylor and Francis Ltd., London, (1977)

27) Jerina, D.M., Thakker, D.R., Yagi, H.,
Pure & Appl. Chem., 50, 1033-1044, (1978)

28) Jerina, D.M., et al,
Polycyclic Hydrocarbons and Cancer 1, 173-188
Gelboin, Harry, V., Ts'o, Paul, O.P., Hrsg.
Academic Press Inc. N.Y. (1978)

29) Jerina, D.M., et al.,
Falk Symposium, 25, 253-261, (1978)

30) Jerina, D.M., et al.,
Adv. Pharamacol. Ther., Proc. Int. Congr. Pharmacol., 7th
1978, 9, 53-62, (1979)

31) Conney, A.H., Levin, W., Wood, W., Yagi, H., Lehr, R.E.,
Jerina, D.M.,
Adv. Pharmacol. Ther., Proc. Int. Congr. Pharmacol., 7th
1978, 9, 41-52, (1979)

32) zitiert nach: Phillips, D.H.,
Nature, 303, 469, (1983)

33) Baron, J., et al.,
Extrahepatic Drug Metabolism And Chemical Carcinogenesis
73-88
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford
(1983)

34) Dipple, A.,
Cancer Res., (suppl.), 43, 2422-2425, (1983)

35) Oesch, F.,
Chemical Carcinogenesis, 1- 24
(Nato advanced study institutes series, A)
Plenum Press New York and London 1982

36) Yang, S.K., McCourt, D.W., Gelboin, H.V.,
Science, 196, 1199-1200, (1977)

37) Yagi, H., Akagi, H., Thakker, D.R., Mah, H.D., Koreeda, M.,
Jerina, D.M.,
J.A.C.S., 99, 2358-2359, (1977)

38) Neidle, S., Cutbush, S.D.,
Carcinogenesis, 4, 415-418, (1983)

39) Malaveille, C., Kuroki, T., Sims, P., Grover, P.L., Bartsch, H.
Mutat. Res., 44, 313-326, (1977)

40) Newbold, R.F., Brookes, P.,
Nature, 261, 52-54, (1976)

41) Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., Lee, F.D.,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2281, (1973)

42) Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E.,
Mut. Res., 31, 347, (1975)

43) Berenblum, J.,
Cancer Res., 1, 44, (1941)

44) Berenbblum, J.,
Cancer Research Today
Oxford 1967

45) Hecker, E.,
Naturwissenschaften, 54, 282-284, (1967)

46) Graffi, A.,
Z. Krebsforsch., 49, 477, (1939)

47) Doniach, I., Mottram, J.C., Weigert, F.,
Brit. J. Exp. Path., 24, Nr. 1, 1-9, (1943)

48) Federoff, S.,
Exptl. Cell Res., 46, 642, (1967)

49) Federoff, S.,
TCA Manual, 1, 53, (1975)

50) Katalog-Ringbuch
Boehringer Mannheim, 1983/84

51) Seromed/Biochrom-Ringbuch
Biochrom (Berlin) 1983

52) Paul,J.,
Zell- und Gewebekulturen
Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1980

53) Bakterientötende Lampen
Deutsche Philips GmbH, Laufende Nr. 710213-710216

54) Rappaport, C.,
Exp. Cell Res., 20, 479, (1960)

55) Grinnel, F., Milam, M., Srere, P.A.,
Arch. Biochem. Biophys., 153, 193-198, (1972)

56) Ham, R.G.,
Exp. Cell Res., 29, 515, (1963)

57) ATCC, Catalogue of Strains II, 3rd Ed.
Rockville, Maryland (1981)

58) CCL-Nummern nach:
American Type Culture Collection
12301 Parklawn Drive, Rockville
Maryland 20852, USA

59) Schlegel, H.G.,
Allgemeine Mikrobiologie, 4. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1976)

60) Aus: Boehringer Katalog-Ringbuch
Arbeitsvorschriften III/40 (1983/84)

61) Sykes, J., Moore, A., Bailey, E.,
Proc. Soc. for Exp. Biol. and Med., 100, 125-127, (1959)

62) Cruickshank, C.N.D., Cooper, J.R., Conran, M.B.,
Exp. Cell Res., 16, 695, (1959)

63) C.A. Greiner, 7440 Nürtingen

64) Guilbault, G.G.,
Practical Fluorescence
Marcel Dekker Inc., N.Y. (1973)

65) Daniels, F., Alberty, R.A.,
Physical Chemistry 3rd Ed., 616
J. Wiley Inc. N.Y., London, Sidney (1967)

66) Becker, R.S.,
Theorie and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence
Wiley- Interscience, London (1969)

67) Förster, Th.,
Fluoreszenz Organischer Verbindungen, S. 89
Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen (1982)

68) Schulman, S.G.,
Fluorescence And Phosphorescence Spectroscopy:
Physicochemical Principles And Practice
Pergamon Press, Oxford, N.Y., Toronto, Sydney, Paris,
Frankfurt, (1976)

69) Zander, M.,
Fluorimetrie S. 13
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, (1981)

70) Ein Mikroskopfluorometer
Sonderdruck aus der Zeiss-Information Nr. 81

71) Puch, F., Leemann, U.,
Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics
14, 329-346, (1973)

72) Larrabee, R.D.,
J. opt. Soc. Am., 49, 619-625, (1959)

73) Wrighton, S.A., Mueller, G.C.,
Carcinogenesis, 3, 1415-1418, (1982)

74) Lee, L.S., Weinstein, I.B.,
J. Cell. Physiol., 99, 451-460, (1979)

75) Kensler, T.W., Wertz, P.W., Mueller, G.C.,
Biochem. Biophys. Acta, 585, 43-52, (1979)

76) Zeeck, E., Kowitz, H.,
Extrahepatic Drug Metabolism And Chemical Carcinogenesis
601-602
Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, Oxford,
(1983)

77) Bertram, J.S.,
Cancer Res., 37, 514-523, (1977)

78) Kowitz, H., Zeeck, E.,
Chem. Biol. Interactions, 53, 365-370, (1985)

79) Horowitz, A.D., Greenebaum, E., Weinstein, I.B.,
Proc. Natl. Sci., USA, 78, 2315-2319, (1981)

80) Lee, L.S., Weinstein, I.B.,
Science, 202, 313-315, (1978)

81) Lee, L.S., Weinstein, I.B.,
J. Cell. Physiol., 99, 451-460, (1979)

82) Frazelle, J.H., Abernethy, D.J., Boreiko, C.J.,
Carcinogenesis, 4, 709-715, (1983)

83) Hennings, H., Yuspa, S.H., Michael, D., Lichti, U.,
Carcinogenesis Vol. 2, S. 233-243
Slaga, T.J., Sivak, A., Boutwell, R.K., (Hrsg.)
Raven Press, New York, (1978)

84) Magun, B.E., Matrisian, L.M., Bowden, G.T.,
J. Biol. Chem., 255, 6373-6381, (1980)

85) Russell, D., Snyder, H.,
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 60, 1420, (1968)

86) Tabor, H., Tabor, C.W.,
Pharmacol. Rev., 16, 245, (1964)

87) Hecht, L.I., Potter, V.R.,
Cancer Res., 16, 988, (1956)

88) Kishore, G.S., Boutwell, R.K.,
Experientia, 37, 179, (1981)

89) Weeks, C., Herrmann, A., Nelson, F., Slaga, T.,
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6028, (1982)

90) Takigawe, R.C., Simsiman, R.C., Boutwell, R.K.,
Carcinogenesis, 4, 5, (1983)

91) Van Rooijen, L.A.A., Derks, H.J.G.M., Van Wijk, R.,
Bisschop, A.,
Carcinogenesis, 5, 225, (1984)

92) O'Brien, T.G.,
Cancer Res., 36, 2644, (1976)

93) Clark, J.L., Fuller, J.C.,
Biochemistry, 14, 4403, (1975)

94) Kallistratos, G.,
Naturwissenschaften, 61, 459, (1974)

95) In Vorbereitung:
Zeeck, E., Kowitz, H.,
Influence of TPA and Serum on BP Accumulation

Lebenslauf

Geboren am 13.08.49 in Weinheim als Sohn der Eheleute Arnold und Emilie Kowitz

Verheiratet seit dem 06.07.76 mit der Lebensmittelchemikerin Iris Kowitz, geb. Gutsch

Geburt des ersten Kindes: 10.06.1980

Geburt des zweiten Kindes: 03.06.1984

Grundschule in Weinheim: 1956-1960

Gymnasium in Weinheim 1960-1969

Studium der Chemie an der Universität Karlsruhe ab WS 1969/70

Immatrikulation in Oldenburg zum WS 767/77

Diplom am 14.11.79

Thema der Diplomarbeit: K-Region-Oxidation kanzerogener polycyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und Bestimmung von Fluoreszenzanregungs- und Emissionsspektren

Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft vom 01.05.77 bis zum 31.03.80

Wissenschaftlicher Mitarbeiter vom 01.04.80 bis 31.03.84

Nebenberufliche Lehrtätigkeit an Berufsbildenden Schulen in Oldenburg: 01.08.80 bis Herbst 85

Erklärung nach § 9 Abs. 2 der Promotionsordnung des Fachbereichs 9 der Universität Oldenburg vom Dezember 1985

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorgelegte Arbeit selbständig verfaßt und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Herbert Konig